

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-536000

(P2002-536000A)

(43) 公表日 平成14年10月29日(2002.10.29)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 Q 1/25		C 1 2 Q 1/25	4 B 0 2 4
1/68		1/68	A 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/545		G 0 1 N 33/545	Z
33/573		33/573	A
// C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
		審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 135 頁)

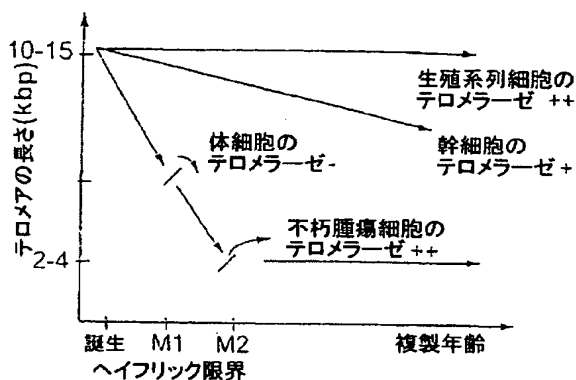
(21) 出願番号 特願2000-597632(P2000-597632)
(86) (22) 出願日 平成12年2月1日(2000.2.1)
(85) 翻訳文提出日 平成13年8月2日(2001.8.2)
(86) 国際出願番号 PCT/IB00/00100
(87) 国際公開番号 WO00/46601
(87) 国際公開日 平成12年8月10日(2000.8.10)
(31) 優先権主張番号 9902302.0
(32) 優先日 平成11年2月2日(1999.2.2)
(33) 優先権主張国 イギリス (GB)
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US

(71) 出願人 フランク ラルセン
ノルウェー王国 オスロ エヌ 0372 ガ
ウスタドヴィーエン 93
(71) 出願人 マリアンヌ スカッセン
ノルウェー王国 コルボトン エヌ 1410
ボーリン ハルス ヴェイ 89
(72) 発明者 フランク ラルセン
ノルウェー王国 オスロ エヌ 0372 ガ
ウスタドヴィーエン 93
(72) 発明者 マリアンヌ スカッセン
ノルウェー王国 コルボトン エヌ 1410
ボーリン ハルス ヴェイ 89
(74) 代理人 弁理士 小谷 悦司 (外1名)
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 テロメラーゼ活性の検出

(57) 【要約】

テロメラーゼが固相に結合する条件下で、該試料を固相で処理する工程、処理済みの該試料から固相を分離し、該固相から結合テロメラーゼを溶出させる処理を選択的に行なって被験試料を作成する工程、および被験試料のテロメラーゼ活性を測定する工程を包含するものである試料中のテロメラーゼ活性を検出する方法である。



【特許請求の範囲】**【請求項1】** 下記工程

- (a) テロメラーゼが固相に結合する条件下で、該試料を固相で処理する工程、
 - (b) 処理済みの試料から固相を分離し、該固相から結合テロメラーゼを溶出させる処理を選択的に行なって被験試料を作成する工程、および
 - (c) 被験試料のテロメラーゼ活性を測定する工程
- を包含するものである試料中のテロメラーゼ活性を検出する方法。

【請求項2】 工程(c)において、前記固相のテロメラーゼ活性を測定するものである請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記試料は標的細胞全体を含み、該細胞を工程(a)により処理して溶解物を作成し、固相に結合させる為にテロメラーゼを遊離させるものである請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 標的細胞全体を含む前記試料は、工程(a)の前に選別工程を行い、試料中の標的細胞全体を単離する細胞集団の混合物を含有するものである請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記選別工程は、フローサイトメトリーによる選別工程、または標的細胞全体に対する固相アフィナント(affinant)に標的細胞全体を結合させる工程を包含するものである請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記アフィナントは、テロメラーゼを結合する為に固相上に存在するものである請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記アフィナントは、標的細胞に特異的な抗体を含有するものである請求項5または6に記載の方法。

【請求項8】 前記アフィナントは上皮細胞に特異的である請求項5～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 前記細胞集団の混合物は、血液、骨髄、胸水、尿、唾液、痰、大便、髄液、頸部スメア、頬側スワブまたは生検針試料に由来するものである請求項4～8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 前記試料はヒト被験者または被験動物から採取されるものである請求項1～9のいずれかに記載の方法を含む癌の診断または予測方法であ

って、テロメラゼ活性の検出が被験者または被験動物における癌の指標となる方法。

【請求項 1 1】 前記細胞集団の混合物をヒト被験者または被験動物から採取するものである請求項 9 に記載の方法を含む癌の診断または予測方法であって、テロメラゼ活性の検出が被験者または被験動物における微小転移巣の指標となる方法。

【請求項 1 2】 前記固相は粒子状材料を含有するものである請求項 1 ～ 1 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3】 前記粒子状材料はポリマービーズを含有するものである請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】 前記ポリマービーズの直径は $1\ \mu$ から $6\ \mu\text{m}$ の範囲内である請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】 前記粒子状材料は磁性を帯びたものである請求項 1 2 ～ 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6】 テロメラゼ活性を測定する前記工程 (c) は、テロメア反復測定プロトコルを用いるものである請求項 1 ～ 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7】 テロメラゼが固相に結合するよう、固相で試料を処理することによって、該試料からテロメラゼを分離する為の固相の使用。

【請求項 1 8】 テロメラゼが固相に結合するよう、固相によって試料を処理し、該固相中のテロメラゼ活性を測定することによって、該試料中のテロメラゼ活性を検出する為の固相の使用。

【請求項 1 9】 請求項 1 ～ 1 6 のいずれかに記載の方法における、請求項 1 8 に記載の固相の使用。

【請求項 2 0】 テロメラゼを結合させる為の固相、およびテロメラゼ活性を測定する為の一種以上の成分を含有するものであるテロメラゼ活性検出用キット。

【請求項 2 1】 前記固相は粒子状材料を含有するものである請求項 2 0 に記載のキット。

【請求項22】 前記粒子状材料はポリマービーズを含有するものである請求項21に記載のキット。

【請求項23】 前記ポリマービーズの直径は1 μ から6 μ mの範囲内である請求項22に記載のキット。

【請求項24】 前記粒子状材料は磁性を帯びたものである請求項21～23のいずれかに記載のキット。

【請求項25】 前記固相は、標的細胞全体を結合させる為のアフィナントを含有するものである請求項20～24のいずれかに記載のキット。

【請求項26】 更に、標的細胞全体を結合させる為の第二の固相を含有するものである請求項20～24のいずれかに記載のキット。

【請求項27】 前記第二の固相は、標的細胞全体を結合させる為のアフィナントを含有するものである請求項26に記載のキット。

【請求項28】 前記アフィナントは、標的細胞に特異的な抗体を含有するものである請求項25～27のいずれかに記載のキット。

【請求項29】 前記アフィナントは上皮細胞に特異的である請求項25、27または28のいずれかに記載のキット。

【請求項30】 テロメラーゼ活性を測定する為の前記一種以上の成分は、テロメラーゼ延長の基質を含有するものである請求項20～29のいずれかに記載のキット。

【請求項31】 前記テロメラーゼ延長の基質は、テロメラーゼを結合させる為の固相上に存在するものである請求項30に記載のキット。

【請求項32】 テロメラーゼ活性を測定する為の前記一種以上の成分は、テロメア反復測定プロトコルの為の成分を含有するものである請求項20～31のいずれかに記載のキット。

【請求項33】 テロメラーゼ活性を測定する為の前記一種以上の成分は、テロメラーゼ産物を増幅する為のオリゴヌクレオチドプライマーを含有するものである請求項20～32のいずれかに記載のキット。

【請求項34】 癌細胞を検出する為の、請求項20～33のいずれかに記載のキットの使用。

【請求項35】 前記キットは、更に、癌を診断する為のmRNAを測定する手段を含むものである請求項34に記載の使用。

【請求項36】 テロメラーゼ延長の基質を有する、テロメラーゼを結合させる為の固相を含有するものであるテロメラーゼ活性を検出する為のアッセイ系成分。

【発明の詳細な説明】**技術分野**

本発明は、試料中のテロメラーゼ活性を検出する方法、および試料中のテロメラーゼ活性を検出する為の固相の使用に関するものである。本発明はまた、試料中のテロメラーゼ活性を検出するキットに関するものである。

【0001】**背景技術****テロメア**

テロメアは、全真核生物の染色体の特異的な末端であり、染色体同士が融合して、核型を変化させたり、ゲノムを不安定にするようなDNA再配列が生じるのを防止する保護キャップの役割を果たしている(Muller, 1938; McClintock, 1941)。「テロメア」という用語は、Mullerが、ギリシャ語の「末端」(telos)と「部分」(meros)に当たる語から造った言葉である。既知のDNAポリメラーゼによって、直鎖DNA分子の末端を複製できないことが分かると、テロメアが細胞増殖において調節的役割を果たすと考えられた(Watson, 1972; Olovnikov, 1973)。Olovnikov(1973)は、細胞分裂とともにテロメアDNAの減損が起き、最終的には、増殖に必須の遺伝子が失われてしまうという考えを唱えた。その後、テロメアは、長さの短縮と安定化との間で動的均衡状態にあることが示された(Greider及びBlackburn, 1987; Morin, 1989)。

【0002】

図1は、テロメア長と複製年齢が反比例することを表すモデルを示すものである。テロメアが短くなって臨界長に達すると、細胞周期を停止せよというシグナルが送られて、老化プログラムが開始する。この点(M1)は、複製寿命の限界を示しており、ヒト培養線維芽細胞についてHayflick(1965)により初めて記述された。その後、この性質は、in vitro またはin vivoで増殖する、その他様々な細胞型についても実証されている(Harleyによる概説、1995)。例えば細胞が、発癌トランスフォーメーションによってM1(ヘイフリック限界)を迂回すると、テロメアは短縮し続け、クライシス(crisis)と呼ばれる第二地点(M2)にまで達し、おそらくテロメアの機能障害によって染色体が生存不能となる為に、大量の細胞死が起

こる。このクライシスから細胞が抜け出す為には、テロメア長及び構造を回復して維持する為の、テロメラーゼを含むテロメア維持装置の活性化が必要となる。M2を抜け出した細胞は無限に分裂することができる。Harley(1991)は、このテロメアDNA減損を、細胞の分裂回数をモニターし、最終的に分裂過程を制限する時計と同等であると考えた。

【0003】

殆どすべての真核生物において、テロメアは、Gを豊富に含む単純な反復DNAとそれに特異的に結合するタンパク質の複合体である。表Aは、テロメラーゼ活性が確認され、かつてロメラーゼのRNA成分が同定されてクロニングされている真核生物を何種類か示している(Greiderによる概説、1996)。各生物のテロメア配列は、テロメラーゼRNAの鋳型領域の配列として、5'→3'方向で示されている。サイズ(nt)は、RNAの長さをヌクレオチド数で示している。ヒトテロメアは、TTAGGGというヘキサマーのタンデムな反復配列を20 kbまで含むことがある(Moyzisら、1988)。

【0004】

【表1】

テロメラーゼのRNA成分			
生物名	テロメア配列	RNA鋳型配列	サイズ(nt)
テトラヒメナ(Tetrahymena)	TTGGGG	CAACCCCAA	159
ユープロテス(Euplotes)	TTTTGGGG	CAAAACCCCAAAACC	190
オキシトリカ(Oxytricha)	TTTTGGGG	CAAAACCCCAAAACC	190
ヒト	TTAGGG	CUAACCCUAC	450
マウス	TTAGGG	CCUAACCCU	450
出芽酵母 (Saccharomyces cerevisiae)	(TG) ₁₋₃	CACCACACCCACACAC	~1300
キラー酵母 (Kluyveromyces lactis)	TTTGATTAGGTATG -TGGTGTACGGA	UCAAAUCCGUACACCAC -AUACCUAUAUCAA	~1300

【0005】

末端複製の問題

通常のDNAポリメラーゼは、全く新しくDNA合成を始めることはできず、5'→3'方向にDNAを複製できるだけである。真核生物の染色体DNA分子の複製は、一般的

には、8から12塩基長のRNAによってプライミングされる。染色体の最末端以外は、このメカニズムで十分である。最後のRNAプライマーが除去されると、新たに複製されたラギング鎖の5'末端には、通常のDNAポリメラーゼでは修復することができない短いギャップが生じると考えられる。この為、特殊な複製機構がなければ、DNAの末端はS期を2回経る毎に8~12塩基対を失うと考えられる(Zakian, 1997)。DNAを失う速さは、分解があったり、最後のRNAプライマーがDNAの最末端に付着しなかったりすれば更に速くなるはずで、実際、細胞一世代あたり50~100塩基対の範囲でテロメア短縮が起こることが報告されている(Harleyら、1990; Counterら、1992; Vaziriら、1994)。

【0006】

テロメラーゼ

DNA末端の複製問題にはいくつかの解決法がある。例えば、タンパク質プライミング、末端ヘアピン構造、および/または組換えが、ある種のウイルスの複製、並びに原核生物および真核生物のプラスミドゲノムの複製に用いられている。しかしながら、単細胞から、ヒトを含む高等動植物まで、殆どの真核生物は、染色体末端を複製する為にテロメラーゼを用いている(Greiderによる概説、1996)。テロメラーゼは、RNAとタンパク質の両成分がテロメアDNAの合成に必要とされるリボ核タンパク質である(Greider及びBlackburn, 1987; Morin, 1989)。テロメラーゼRNAは、末端RNAプライマーを除去した後に残る3'突出を伸長させる為の鋳型(表A)として有用な8から30塩基のセグメントを含む。テロメラーゼは、図2に示すような(結合したタンパク質成分は示していない)テロメラーゼRNAによってコードされる短い配列のタンデムな反復配列を生成させる。(a)では、染色体の3'末端が、RNAの鋳型領域の3'末端付近で整列している。鋳型領域全体で、ヒトテロメラーゼ配列の約1.5反復配列分に相補的になる(表A)。(b)では、テロメア伸長が、鋳型領域の5'末端まで進んでいる。(c)では、テロメラーゼは転位して、別のテロメア合成を開始できる様になる(Harley及びVillenponteau, 1995より改作)。テロメラーゼが3'鎖を伸長させた後、おそらく、通常のDNAポリメラーゼが相補鎖を合成することになる。

【0007】

テロメラーゼ活性は、1985年にGreider及びBlackburnによって、絨毛原生動物であるテトラヒメナ (Tetrahymena) で初めて生化学的特徴が明らかにされた。特徴が調べられたテロメア全ての構造が類似していることから、Greider及びBlackburn(1985)は、すべての真核生物に共通するテロメア複製方式があるはずだと主張した。4年後に、非常によく似た生化学的活性が不朽ヒトHeLa細胞株で確認されることにより、この主張が裏付けられた(Morin, 1989)。テトラヒメナテロメラーゼのRNA成分のクローニングによって、この新規DNAポリメラーゼの作用メカニズムのいくつかの側面が明らかになった(Greider及びBlackburn, 1989)。テトラヒメナのRNA成分の予想鋳型領域は、テロメア配列(表A)の1.5反復分に対する相補鎖であるが、この結果は、上記領域を変異させて、変異RNAをin vivoで過剰発現させると、予想通りにテロメア配列が変化することが実証され、確認されている(Yuら、1990)。

【0008】

テトラヒメナ酵素の性質は、他の生物材料から単離した酵素にも共通するものが多く、その為、テトラヒメナが有用なモデル生物となっている。テロメラーゼは、テロメア配列プライマーに選択的に結合して、それを非テロメア配列まで伸長させる。しかしながら、同族のテロメア反復以外のテロメア類似配列でも、有効なプライマーとなる(Greider及びBlackburn, 1987)。従って、テトラヒメナから抽出したテロメラーゼは、絨毛動物、ヒト、植物、および酵母ほども異なる生物に由来するテロメア反復からなるプライマーを伸長させるはずである。このようなテロメラーゼの性質は、様々な生物由来のテロメアが酵母で機能できることと平行している(SzostakとBlackburn, 1982; Plutaら、1984)。ユニークな配列に対して非特異的にテロメアプライマーを選択的に伸長できるというテロメラーゼの能力は、テロメラーゼがGを多く含むオリゴヌクレオチド配列に対して一般的に親和性を有することを示唆している(Lee及びBlackburn, 1993; Morin, 1991; Harrington及びGreider, 1991; Collins及びGreider, 1993)が、これは、多くのDNAおよびRNA結合タンパク質が高親和性配列に特異的な認識を示すことと異なっている。

【0009】

テロメラーゼの発現

テロメラーゼ活性は、正常な末梢血細胞および正常な骨髄において低レベルであるが検出されている(Counterら、1995; Broccoliら、1995; Hiya^マ, K.ら、1995; Wengら、1996; Hohausら、1997)。その後の研究によって、細胞材料がより明確に特定されている。テロメラーゼは、成熟した好中球では検出されないが、Bリンパ球とTリンパ球では活性がある。正常な骨髄由来の未分画単核球細胞も、大抵、末梢血単核球と同程度にテロメラーゼ活性を発現する。骨髄細胞を分画したところ、低レベルの活性が幹細胞(CD38⁺、CD38⁻)で見られること、および、この活性は、より成熟した前駆細胞(CD34⁺/CD71⁺/CD38⁺)で上昇し、成熟しつつあるCD34⁺細胞では再び減少することが明らかになった(Engelhardtら、1997)。

【0010】

精巣および卵巣でもテロメラーゼ活性を発現していることが示されている(Kimら、1994; Wrightら、1996)。従って、皮膚の基底細胞と幹細胞(Taylorら、1996; Harle-Bachorら、1996; Yasumotoら、1996; Ramirezら、1997)、腸陰窩細胞(Hiyamaら、1996a)、閉経前の女性の子宮内膜(Kyoら、1997; Brienら、1997)および増殖中の内皮細胞(Hisaoら、1997)で実証されている様に、一般的に、幹細胞が多少のテロメラーゼ活性を示すことは十分に考えられることである。テロメラーゼ活性は、不朽細胞の分化を誘導すると抑制される(Holtら、1996b; Sharmaら、1995; Bestilnyら、1996; Xuら、1996; Asaiら、1998)。このことから、テロメラーゼ活性の抑制には少なくとも2つの経路があるという作業仮説が立てられた(Holtら、1996a)。一つの経路は、発生後期に殆どの体細胞組織でテロメラーゼを抑制する(Wrightら、1996)。これら、生体細胞の大部分を代表する体細胞は、増殖状態にあるにもかかわらずテロメラーゼ活性を発現しない。身体のその他の細胞はテロメラーゼ成分をもっている。もう一つの経路は、テロメラーゼ活性を可逆的に調節して、細胞が増殖している間は活性が現れ、静止状態になると抑制される様にする。このモデルによって、これ以外の仮説では矛盾する様々な結果、即ち、テロメラーゼ活性は精巣と卵巣では見られるが、精子や卵子では見られないこと、初期胚形成時には見られるが、胎児が成長するのに伴って減少し、新生児の体細胞組織の殆どでは見られなくなることがうまく説明できる(Wright

ら、1996)。最も原始的な幹細胞では、より成熟した細胞に比べて低活性であること(Counterら、1995; Hiyama K. ら、1995)は、第二の経路によって説明することが可能な別の現象である。しかしながら、これらの細胞の殆どは静止状態にあり、増殖している子孫細胞がより高レベルのテロメラーゼ活性を発現する(Wrightら、1996)。

【0011】

B細胞の分化過程では、テロメア長とテロメラーゼ活性の両方が密接に調節されていることが分かった(Wengら、1997b)。すでに特徴が分かっている、体細胞分裂過程でのテロメア短縮モデルと対比してみると、胚中心B細胞では、前駆の単純(naive)B細胞や後代の免疫記憶B細胞よりもテロメアが有意に長い。胚中心B細胞では、他のB細胞集団に比べて、テロメラーゼ活性が、テロメア長の増加と相関しながら顕著に増加した(Wengら、1997b)。単純B細胞および免疫記憶B細胞では、in vitroでの活性化によって、高レベルのテロメラーゼ活性が誘導される。これらの結果は、テロメラーゼが、テロメアを伸長させて、胚中心B細胞および免疫記憶B細胞の複製寿命を保存することによって、免疫応答において重要な役割を果たしていることを示唆している。

【0012】

テロメラーゼのRNA成分の発現

正常な体細胞の殆どでテロメラーゼ活性が検出されない場合でも、ヒトテロメラーゼRNA成分(hTR)は、正常な体細胞で検出可能なレベル発現していることが明らかになっている(Fengら、1995)。しかしながら、T細胞の進化およびin vitroでのT細胞活性化の過程の両方において、テロメラーゼ活性の上方制御とhTR発現の上方制御とが平行することが観察されたことは、hTRレベルの調節が、リンパ球等の正常体細胞におけるテロメラーゼ活性全体の制御に寄与していることを示唆している(Wengら、1997b)。hTRの発現はテロメラーゼ活性に必要ではあるが十分ではない。そして、休止(resting)リンパ球で検出可能レベルのhTRをもちながらテロメラーゼ活性が見られないことは、他のテロメラーゼ成分の一つ以上が十分量発現されていないのか、或いは、これらの細胞にはテロメラーゼを抑制する為の優位なメカニズムがあるのかのいずれかによるのであろう(Wengら、1997b)

。

【0013】

触媒サブユニットおよびその他のテロメラーゼ結合タンパク質

これまでに調べられた不朽化ヒト細胞株はすべて、テロメラーゼ活性をもつか、これに代わるテロメアを伸長するメカニズムがあるという証拠を示している(Bryanら、1997)。これは、不朽化におけるテロメア維持の重要性に関し、非常に強力な状況証拠を示すものである。テロメラーゼの触媒サブユニットであるhTERT(初期には、hTRT、hEST2、hTCS1またはTP2と略記されていたヒトテロメラーゼ逆転写酵素human telomerase reverse transcriptase)が、最近同定されてクローニングされた(Nakamuraら、1997; Meyersonら、1997; Kilianら、1997)。hTERTをコードする遺伝子は、ヒトゲノムの中に1コピー存在するが、複雑なスプライシングパターンで発現する。hTERT遺伝子の転写調節のほか、テロメラーゼ活性の調節にはテロメラーゼ触媒サブユニットの選択的スプライシングが重要であり、異なった生化学機能を有するタンパク質が生じている可能性がある(Kilianら、1997; Ulanerら、1998)。

【0014】

hTERTの発現は、組織および株化細胞における既知のテロメラーゼ状態と正の相関関係を有し、in vitroでクライシスを経験させた後の株化細胞、相当量の幹細胞成分をもつ正常組織、および一定範囲の腫瘍において選択的に起こる(Nakamuraら、1997; Meyersonら、1997; Kilianら、1997; Kolquistら、1998; Kanayaら、1998)。これらの知見により、ヒトテロメラーゼ複合体の重要な成分が明確となり、その発現は、哺乳動物におけるテロメラーゼ活性の分布を決定する主要な因子であることを示唆している。hTERTの重要性は、単一アミノ酸が、保存されているテロメラーゼに特異的な逆転写酵素(RT)モチーフに変化し、テロメラーゼ活性が低下または消失したことから明らかになった(Weinrichら、1997)。更に、トランスフェクション実験によって、正常な二倍体細胞では、テロメラーゼ活性化によってhTERTが律速因子となることが示されている(Weinrichら、1997; Bodnarら、1998; VaziriとBenchimol, 1998)。最近、長期間増殖能力をもつと考えられている正常なテロメラーゼ陰性組織の特定サブセット中に、hTERT mRNAが存

在することが示されたが、そのレベルでは、テロメアの維持または伸長に必要な閾値を超えたテロメラーゼレベルとは言えないようである(Lolquistら、1998)。

【0015】

RT様テロメラーゼタンパク質は触媒作用に関係しているが、完全なテロメラーゼ集合体、機能および調節には、テロメアおよびテロメラーゼ結合タンパク質等、更に別のタンパク質が必要である。テロメラーゼ複合体に結合するが、触媒サブユニットではないと考えられた2種類のタンパク質サブユニットがテトラヒメナで同定されている(p80とp95)(Collinsら、1995)。そして、哺乳動物のホモログであるTP1が同定された(Harringtonら、1997; Nakayamaら、1997)が、そのRNA転写物はテロメラーゼ活性と相関しない。ヒトテロメア反復結合因子のクローニングと特徴づけによって、ヒトテロメアは、特殊な核タンパク質複合体を形成することが明らかになった(Chongら、1995)。最近になって、このタンパク質TRF1がテロメア長の調節に関係していることが報告された(van Steensen¹及びde Lange、1997)。

【0016】

癌細胞におけるテロメラーゼの発現

テロメラーゼ活性は、不朽ヒト細胞集団および悪性腫瘍では見られたが、この段階の前では一般的に活性が見られないことから、大部分のヒト腫瘍の進行及び臨床上の死にとっては、細胞の不朽化及びテロメラーゼ再活性化が必須であるが、その形成には必須でないことが示唆されている(Kimら、1994; Edingtonら、1995)。多くの癌症例において、細胞がMI期を克服して、その寿命を延ばすことを可能にするp53やpRb等の腫瘍抑制因子を不活性化(図1)することによって、更なる変異の蓄積が生じ、直接的にゲノムの不安定化が導かれることになる(Harley、1991、1995)。多くのヒト腫瘍の場合に見られる様に、テロメアを非常に短いままで維持すれば、染色体末端を安定化させて、細胞分裂させるのには十分であろう。しかしながら、このような安定化では、染色体組換えが増加する可能性を抑えることは全くできず、ゲノムの不安定と腫瘍進行をもたらすかもしれない。

【0017】

テロメラーゼ活性を検出する為に用いられる方法は、TRAPアッセイ法と呼ばれ

ている(テロメア反復増幅プロトコル telomeric repeat amplification protocol)(Kimら、1994)。細胞を、テロメラーゼ活性がそのまま維持されるような方法で溶解する。添加した合成オリゴヌクレオチドを酵素で伸長させた後、検出を行なう為、特異的なテロメア産物をPCRで増幅する。この方法によって、テロメラーゼ研究分野での実験が大いに簡易化された。これまでに、ヒト腫瘍の殆どすべてのタイプで、この酵素の存在がスクリーニングされ、895種類の哺乳動物腫瘍を調べた中で759種類(即ち85%)でテロメラーゼ活性が発現していることが分かった(ShayとBacchetti、1997)。

【0018】

テロメラーゼ陽性の悪性腫瘍細胞だけでなく、テロメラーゼ陰性の体細胞においてhTRが発現していることは、このRNA成分だけが、酵素活性に必要な唯一の因子でないことを示しているにちがいない。これは、*in vitro*で腫瘍細胞の分化を実験的に誘導している間にテロメラーゼ活性が減少しても、hTRレベルは影響を受けず(Fengら、1995)、様々な腫瘍におけるhTRレベルからは、腫瘍におけるテロメラーゼ活性レベルを予測できるとは言えない(Avilionら、1996)という知見とも合致する。

【0019】

これとは対照的に、hTERTはテロメラーゼ活性と相関関係がある(Nakamuraら、1997; Meyersonら、1997; Kilianら、1997; Kolquistら、1998; Kanayaら、1998)。hTERTの発現は、培養細胞を不朽化する過程でテロメラーゼの活性化と同時に上方制御され、*in vitro*での細胞分化過程で下方制御される(Meyersonら、1997)。これらの結果は、細胞の不朽化と腫瘍進行の過程では、hTERT mRNA発現の誘導にはテロメラーゼ活性が必要であることを示唆している。

【0020】

診断マーカーおよび可能な予後マーカーとしてのテロメラーゼ

テロメア長とテロメラーゼ活性との間の関連が、癌および老化に関与しているとすると、腫瘍細胞におけるテロメラーゼ活性を解析・定量することは理に適っている。これは、診断マーカーおよび予後マーカーとなり得、また、それ自体治療標的となり得る。現在あるデータは、テロメラーゼが、今までに知られた中で

最も特異的で普遍的な腫瘍マーカーであることを示唆している。更に、多くの研究によって、いくつかの癌においては、テロメラーゼ発現が臨床結果と相関関係があることを示しており (BacchettiとCounter, 1995; ShayとWright, 1996; ShayとBacchetti, 1997; Leら、1998; Yoshidaら、1998)、このことは、テロメラーゼが、この様な癌においては診断マーカーとしてだけでなく予後マーカーとしても用いることができることを意味している。一般的に、テロメラーゼ活性レベルは、癌疾患の重篤度が増すにつれて増加する (Counterら、1995; Hiyama E.ら、1995a, 1996a)が、同じタイプや同じ段階にある腫瘍の間でもかなり変動する。収集されたデータは、テロメラーゼが普遍的且つ特異的な腫瘍マーカーであることを示している (Bacchetti及びCounter, 1995; Leber及びBacchetti, 1996; Shay及びWright, 1996; ShayとBacchetti, 1997)。テロメラーゼ活性の存在によって、正常なテロメラーゼ受容細胞か癌細胞の存在を示し得る。同様に、テロメラーゼ活性がないことは、テロメラーゼ無発現 (silent) 正常細胞、または正常なテロメラーゼ受容細胞の休止状態を示しているかもしれない。従って、テロメラーゼ活性レベルの予後的な価値は、対照実験を注意深く行わないかぎり制限されるものである。このことは、ある種の造血細胞が低レベルのテロメラーゼ活性を示す為、血液および骨髄を循環性癌細胞の検出が複雑になるという事実によって具体的に説明される。

【0021】

高レベルの酵素が存在すると、神経芽腫における臨床結果が悪くなるという相関関係がある (Hiyama E.ら、1995a, 1996a)。興味深いことに、高頻度で自然後退を起こすことが知られている疾病段階である転移性IV-S神経芽腫を患う患者は、一般に、テロメラーゼ活性が低いか、全くない。事実、腫瘍テロメラーゼ発現のない患者は、腫瘍の後退が自然に見られた。また、神経芽腫患者において、テロメラーゼRNA成分が高レベルになると、臨床結果が悪くなるという統計学的な相関関係を示すことが明らかになっている (Kim, 1997)。乳癌の臨床結果といくつかの予後指標は、テロメラーゼ活性レベルと有意な相関関係を示すことが分かっている (Hiyama E.ら、1996b; Kim, 1997)。同様に、胃癌の85%でテロメラーゼ活性が見られ、陰性症例の大部分は初期段階のものであった (Hiyama E.ら、1995

b; Taharaら、1996)。Chadeneauら(1995)は、テロメラーゼ活性は、結腸直腸癌腫では検出されるのに、結腸の腺腫様ポリープでは検出されないことを明らかにした。この様に癌腫および神経芽腫に関しては、テロメラーゼの状態を把握することは予後的価値がある。

【0022】

テロメラーゼの発現は、疾病の結果を予測する為の有用なマーカーとなり得る。更に、この様な新規のマーカーは、癌患者に対する適切な治療法を決定する為の新しい情報を提供するかもしれない。最近、ヒト睾丸癌でシスプラチン治療によってテロメラーゼ活性が阻害されたこと(Burgerら、1997)、およびhTRの鋳型領域に相補的なRNAを発現するレトロウイルスを導入すると、別の悪性腫瘍細胞におけるテロメラーゼ活性が阻害されたこと(Bisoffiら、1998)が明らかになった。予後マーカーの価値は、問題となっている腫瘍の病原性により、明確な治療法の選択肢が明らかに存在する場合に最も顕著に見られる。即ち、テロメラーゼに基づく予後アッセイ法は、例えば、テロメラーゼの発現レベルについて原発性腫瘍をスクリーニングするか、循環性癌細胞(微小転移巣)をスクリーニングすることによって、リンパ節陰性の乳癌患者を区別することができるかもしれない。後者の患者の場合、腫瘍の再発、および転移性疾患を伴う可能性が高いので、攻撃的な治療法による恩恵を一層強く受けることになる。癌細胞の分化を誘導するとテロメラーゼ活性が停止し得るという証拠がある為、テロメラーゼの検出は、癌治療過程における予後マーカーとなり得る(Sharmaら、1995; Bestilnyら、1996; Xuら、1996)。

【0023】

微小転移巣

例えば乳房撮影等、ルーチンのスクリーニング過程により、不審なしこりを検出することができる。このしこりのサンプルを採取すれば、病理学者は、細胞が悪性であるか否かを容易に診断することができる。しかしながら、癌患者の運命を決定するのは極めて難しい。癌患者の運命は、直接観察することが非常に困難な細胞状態、即ち、身体中に悪性細胞が広がって二次腫瘍を誘発する転移に依存するからである。癌治療が失敗したときの、死亡の主な原因は通常、転移である

。原発性癌を早期に検出し、転移が起こる前に除去すれば、癌は根絶する。他方、診断時に顕微鏡レベルで転移(微小転移巣)や二次腫瘍がすでに存在していても、予後が重要であり、より高度の治療が必要とされる。治療しないまま放置すると、通常、これらの転移が増殖して死に至る。従って、癌の早期検出が最も重要であり、転移の検出、更には微小転移巣の検出が、適格な治療法を選択するうえで重要である。

【0024】

初期段階における癌細胞、および血液中または骨髄中の微小転移巣を検出するに当たり問題となるのは、莫大な正常細胞の中から僅かな癌細胞を検出するという問題である(Pelkeyら、1996)。この為に必要な検出システムは、細胞を、それが存在しないはずの部位に置くこと、癌細胞には存在するが、正常細胞には存在しない成分、上記二つの組合せに基づいている。

【0025】

現在汎用されている技術は、顕微鏡下で癌細胞を検出するというものである。この方法は、異常な位置に存在する細胞によって可能になる、癌細胞を選択的に染色することによって容易に検出される。この方法の例として、上皮細胞特異的タンパク質であり、血液または骨髄を循環している癌細胞にも見出されるサイトケラチンの染色が挙げられる。別の可能性として、mRNAを単離し、癌細胞の中で大なり小なり特異的に発現している遺伝子を増幅することが挙げられる。後者のアプローチは非常に難しく、これは、組織特異的遺伝子は通常、非常に低レベルではあるが、所謂「非発現細胞」の中にも存在している為である。例えば、癌細胞1個あたりでは10000コピー、正常細胞では1個あたりmRNA1個という様に、発現に大きな相違が起こり得る。しかしながら、これは、稀な癌細胞と正常細胞の比率が、例えば、1対100万等という比率になれば非常に影響力が出てくる(例えば、mRNAの比は、癌細胞では10000コピー、正常細胞では100万コピーになる)。勿論、この様なことは、過剰量の正常結腸細胞の中から大便中の結腸癌細胞を検出しようとするときの如く、癌細胞が「正常」環境下にある場合には殆ど不可能となる。

【0026】

上述した顕微鏡によるアプローチおよびmRNAによるアプローチは共に、正常細胞を除くか、癌細胞を積極的に選択して癌細胞を濃縮することにより利用可能となる(Hardinghamら、1993、1995; Eatonら、1997; Naumeら、1997; Lyckeら、1997)。しかしながら、これらの方法はいずれも、例えば、血液中または骨髄中の上皮由来癌細胞の如く、多かれ少なかれ、「異常な」環境下にある癌細胞を検出できるという能力に基づくものである。

【0027】

本発明は、先行技術の問題点を克服することを目的とするものである。

【0028】

発明の概要

第一の態様において、下記工程

(a)テロメラーゼが固相に結合する条件下で、該試料を固相で処理する工程、

(b)処理済みの試料から固相を分離し、該固相から結合テロメラーゼを溶出させる処理を選択的に行なって被験試料を作成する工程、および

(c) 被験試料のテロメラーゼ活性を測定する工程

を包含するものである試料中のテロメラーゼ活性を検出する方法を提供する。

【0029】

更なる態様において、本発明は、テロメラーゼが固相に結合するよう、固相で試料を処理することによって、試料からテロメラーゼを分離する為の固相の使用を提供する。

【0030】

更なる態様において、本発明は、テロメラーゼが固相に結合するよう、試料を固相で処理し、固相中のテロメラーゼ活性を測定することによって、試料中のテロメラーゼ活性を検出する為の固相の使用を提供する。

【0031】

更なる態様において、本発明は、テロメラーゼを結合させる為の固相、およびテロメラーゼ活性を測定する為の一種以上の成分を含有するものであるテロメラーゼ活性検出用キットを提供する。

【0032】

更なる態様において、本発明は本明細書に記載する通り、癌細胞検出用キットの使用を提供する。

【0033】

更なる態様において、本発明は、テロメラーゼ活性測定用アッセイ系成分であって、テロメラーゼ伸長の基質が存在する固相で、テロメラーゼ結合用固相を含有するアッセイ系成分を提供する。

【0034】

発明の詳細な説明

以下、実施例のみに基づき、本発明を更に詳しく説明する。

テロメラーゼアッセイ法（実施例1）

テロメラーゼ活性を測定する為に用いられる方法は、TRAPアッセイ法（テロメア反復アッセイプロトコール）と呼ばれる方法である（Kimら、1994）。目的の細胞を、テロメラーゼ活性をそのまま維持する方法で溶解する。合成オリゴヌクレオチドを溶解物に加え、この混合物を37℃でインキュベートし、このオリゴを使ってテロメラーゼの伸長反応を行わせる。この特異的なテロメア産物をPCRで増幅して検出する。しかしながら、この方法では依然として、 ^{32}P 標識反応産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析するという工程を包含している（Kimら、1994）。内部標準を取入れる等の改変（Wrightら、1995）によって、アッセイ法の信頼度が向上した。TRAPアッセイ法をシンチレーションプロキシミティーアッセイ技術（SPA）と組み合わせることにより、更なる改善がなされた（Savoyskyら、1996）。これにより、電気泳動の工程が省略される為、アッセイ速度が上昇する。ところで、TRAP-PAGEでは、検出限界はアッセイ1回あたり約100細胞であるが、TRAP-SPAの場合には、せいぜい10細胞しかなくても、テロメラーゼ活性を明瞭に検出することができる。プライマーデザインの向上及び半定量的アッセイ法の開発によっても、アッセイ法の信頼度が向上した（Kim及びWu、1997）。

【0035】

現在のところ、殆どの癌診断において最も基準となる検査は組織病理学検査であり、多くの場合、疑いのある組織を生検することにより正確に評価することが

できる。従って、テロメラゼアッセイ法の最も重要な臨床的用途としては、血液、骨髄、尿、痰、及び様々な洗浄液から得られる材料等、採取可能な体液中の癌の診断が挙げられる。更に細い生検針、頸部スミア、及び糞便中の細胞解析もまた、原発性癌の早期診断を改善するうえで有用である。

【0036】

テロメラゼ酵素複合体の単離方法

TRAPアッセイ法を行なう前、細胞を単離する為の磁気ビーズによる最初の実験で紛らわしい結果が出た。磁気によって分離した細胞を、TRAPezeキット (Oncor Inc. 米国) に含まれていた溶解用バッファーで溶解し、磁気ビーズを除去してから、溶解物を用いてテロメア反復アッセイプロトコルを行なった。その結果、強い陽性を示すことが明らかな株化細胞でさえ、活性がないか、或いは非常に弱い活性しか見られなかった。驚くべきことに、テロメラゼ活性は、細胞の溶解後は磁気ビーズに追従し、十分なビーズが存在すると、溶解物中のすべての活性が失われてしまう (実施例 2、3、4、7)。本発明者らは、これを、簡易且つ迅速に、粗溶解物からテロメラゼ複合体を単離する方法へと発展させた。TRAPアッセイ法は、溶解物によって阻害され易いことが報告されているが、このことは特に、解析する材料が多すぎるときに当てはまる (Broccoliら、1995; Norrback 1996)。まず、TRAP反応が阻害されない条件を同定する為、各抽出毎に、TRAP反応を行わなければならない。この反応は通常、溶解物中のタンパク質量を測定し、各アッセイにつき、 $0.1\mu\text{g} \sim 1.0\mu\text{g}$ を含む試料を用いて行なわれるが、これは、 $2.5\mu\text{g} \sim 25\mu\text{g}$ で阻害を受けることが報告されているからである (Broccoliら、1995)。内部対照を含有することによって、僅かな阻害でも検出することができる (Wrightら、1995)。陰性の試験結果が出た試料のうちいくつかは、実際には、TRAPアッセイの阻害により偽陰性であることが明らかになった (Suginoら、1997)。テロメラゼ複合体を単離することによって阻害を回避することができ、より多量の試料中テロメラゼ活性をスクリーニングすることができる。これは例えば、血液、骨髄または組織中の幹細胞や、リンパ節中の癌細胞転移または循環性微小転移巣等、テロメラゼ陽性細胞が試料中の微量画分を代表しているときに、特に有用である。

【0037】

本発明者らは、抗体で被覆した $2.8\mu\text{m}$ (実施例2、8、9)または $4.5\mu\text{m}$ の大きさのビーズ、これらと同じ大きさの被覆されていない磁気ビーズ、およびダイナビーズ(Dynabeads)DNA DIRECT(実施例3、4)という、様々な種類の磁気ダイナビーズ(Dynabeads)を使っていたが、これまでに調べたビーズタイプはすべて、テロメラーゼ複合体を単離するものであった。テロメラーゼが染色体DNAの末端に作用するという事実からすれば、テロメラーゼは、染色体DNAを介して磁気ビーズに間接的に結合していたという仮説が当然出てくる。DNAを単離する為に開発されたビーズは、テロメラーゼを捕捉する為にも使用できることが示されたとき、この仮説が裏付けられた(実施例3)。この仮説を証明する為には、テロメラーゼを単離した後のビーズ画分にDNAが存在することを示す必要があったが、テロメラーゼを単離した後の溶解物中にDNAが残っていた為、この仮説は否定せざるを得なかった(実施例4)。

【0038】

本研究で用いられる磁気粒子は、DNA単離用に開発されたものを除けば、芳香族エポキシドモノマーで被覆されており、親水性表面を有している為、一般に、生体分子を固定することができる。この親水性表面によって、捕捉された酵素の変性が抑えられ、時間経過に伴う酵素活性の失活が抑制される為、疎水性表面に比べて有用である。本発明者らは、いかなる説明による限定も受けたくはないが、可能性が高い説明として、テロメラーゼは、他のタンパク質、タンパク質複合体、およびRNA-タンパク質複合体と共に、テロメラーゼ複合体の非特異的結合を介して、磁気ビーズによって単離されたことが挙げられる(実施例6)。本発明者らはまた、このテロメラーゼ複合体単離法は、あらゆる種類のタンパク質、RNA、または複合体を単離するのに有用であり、固相表面の性質を変化させることによって設計できると考えている。TRAPEzeキットの溶解用バッファーには、0.5% CHAPS、1 mM EGTA、5 mM β -メルカプトエタノール、および0.1 mMベンズアミジンが含まれている。これにより、細胞は溶解するが、強力な変性成分を含有していない為、RNAとタンパク質の複合体はそのまま維持される。

【0039】

行った実験(実施例2～9)によれば、磁気ビーズに付着したテロメラーゼ複合体は、細胞溶解物を除去した後も酵素活性を維持していることが示されている。このことは、捕捉されて精製されたテロメラーゼ複合体を有するビーズを直接TRAP混合液に加えて、テロメアの酵素的伸長反応を行わせた後、テロメア産物をPCRで増幅できることを示唆している。単離されたテロメラーゼはまた、テロメラーゼ活性検査用として、如何なる種類の方法にも使用することができる。

【0040】

テロメラーゼ活性が磁気ビーズに追従するという知見により、テロメラーゼ測定が非常に簡易になった。本発明法の主な利点は、偽陰性となるアッセイのインヒビターを含有する恐れのある溶解物から、テロメラーゼ複合体を分離できることである。また、過剰量の細胞抽出物をTRAPアッセイに添加しても、テロメラーゼ活性を阻害することができる(Broccoliら、1995)。以前、テロメラーゼ伸長反応の後、テロメラーゼ陰性試料をフェノールホルムで抽出すると、これらの試料の30%にPCRインヒビターが存在することが明らかになった為、陰性TRAPアッセイは慎重に解釈する必要がある(Suginoら、1997)。上皮細胞に対する抗体で被覆した磁気ビーズ(実施例2、8)、非被覆エポキシドビーズ(実施例4)、及びDNAを単離する為に開発された磁気ビーズ(実施例3)を、テロメラーゼ捕捉用を使用すれば、酵素活性検出の為にTRAPアッセイを行なうとき有利である。溶解用バッファーをテロメラーゼ複合体とビーズから分離すると、偽陰性の結果が生じる可能性は低くなる。

【0041】

磁石を用い、細胞溶解物からビーズとテロメラーゼの複合体を分離した。テロメラーゼとビーズの複合体を新しい溶解用バッファーまたは蒸留水(dH_2O)に再懸濁する前に、テロメア合成およびPCR増幅の為に、この様にして干渉因子を溶解物と一緒に取除いた。きれいなビーズ画分が得られれば、たとえ検出限界付近で実験を行なったときでも、アッセイの信頼度が向上する(実施例7)。混入因子の殆どを除去すれば、偽陰性の結果が得られる可能性が低くなるので、TRAP法の信頼度が向上することになる。腫瘍に粘性がある為に偽陰性の試験結果が得られることに伴う問題がある場合であっても、おそらく利点となるだろう(Dugganら、1

998)。磁気ビーズを用いてテロメラーゼを単離し、酵素による合成を行う前に粘性の溶解物を除去することができる。

【0042】

Kavalerら(1998)が放射性標識によって得たのと同じ感度が、テロメラーゼ単離法により、全く同じプライマー、バッファー、およびPCR条件を用いて放射性標識をしなくとも得られた。この様にいずれの実験においても約50細胞という感度が得られる為、放射線により、視覚化に十分な強度のシグナルを得る為に長時間X線フィルムを曝露することを避ける為にも、放射性標識を用いるよりは、テロメラーゼを単離する為に固相を使用する方法が選択されるはずである。

【0043】

免疫磁気分離法によらずに癌細胞を分離するときにも、ビーズを用いてテロメラーゼを捕捉することができる。細胞溶解物にビーズを直接加えれば、遠心分離を行わなくても、溶解物からテロメラーゼ複合体を単離して分離することができるので、こちらの方が、機能的(functional)酵素においてはより緩やかな処理といえる。テロメラーゼ捕捉用に磁気ビーズのような固相を使用することによるもう一つの利点は、おそらく単離操作における収率であろう。

【0044】

テロメラーゼの単離に用いる固相

固相としては、現在、固定、分離、精製等に汎用されているか、その予定がある既知の支持体またはマトリックスのいずれをも使用できる。これらは、粒子、シート、フィルター、膜、キャピラリ、マイクロタイターストリップ(microtitre strip)、チューブ、プレート、ウェル、またはバイオチップ等の形態として適用される。

【0045】

支持体は通常、ガラス、シリカ、ラテックス、セルロース、アガロース、または任意のポリマー材料より作成することができる。好ましいのは、テロメラーゼ複合体、及び他のタンパク質またはタンパク質複合体が結合する為の表面積が大きい材料である。この様な支持体としては一般に、不規則な表面をもち、例えば粒子、繊維、織物、シンター(sinter)または篩等、多孔性または粒子状のものが

挙げられる。一般にはビーズ等の粒子状素材、特にポリマービーズは結合力が大きい為、好適である。

【0046】

本発明に用いられる粒子状固相としては通常、球状ビーズが挙げられる。ビーズの大きさは重要ではないが、例えば直径は少なくとも1、好ましくは、少なくとも $2\mu\text{m}$ という程度の大きさであり、最大直径は、好ましくは $10\mu\text{m}$ を超えず、更に好ましくは $6\mu\text{m}$ を超えないものであれば良い。例えば、直径 $2.8\mu\text{m}$ と $4.5\mu\text{m}$ のビーズが有用であることが分かっている。

【0047】

単分散粒子、即ち、例えば直径の標準偏差が25%未満、好ましくは10%未満、より好ましくは5%未満である、実質的に均一な大きさの粒子は、非常に均一な反応再現性を示すという利点がある。US-A-4336173に記載の方法によって製造された単分散ポリマー粒子は特に好適に用いられる。

【0048】

本発明法で使用するのに適した非磁気ポリマービーズは、Dyno particles AS社(Lillestrom、ノルウェー)、Seradyn社(Indianapolis、米国)、Qiagen社(ドイツ)、Amersham Pharmacia社(英国)等から購入することができる。本発明法で使用するのに適した磁気粒子は、Dyna1社(Oslo、ノルウェー)、Seradyn社(Indianapolis、米国)、Scigen社(Sittingbourne、英国)等から購入することができる。

【0049】

しかしながら、操作と分離をやり易くするには、磁気ビーズの方が好適である。本発明で用いられる「磁気」とは、支持体が磁場に置かれたとき、与えられた磁気モーメントをもつことができ、磁場の作用下で移動できることを意味する。換言すると、磁気粒子を含む支持体は、磁石を容易に集合させて取除くことができる為、細胞および分子の結合工程の後、粒子を分離するのに迅速、簡便且つ有用な方法を提供することができる。この方法は、細胞を破壊し、分子を分解し、或いは単離された成分の生物活性を破壊し得る剪断力を生じる遠心分離の如き従来技術に比べ、苛酷な方法では決してない。

【0050】

従って、本発明の方法を用いれば、例えば永久磁石等により磁場をかけることによって、テロメラーゼ複合体および他のタンパク質またはRNA-タンパク質複合体を付着させた磁気粒子を適切な表面に移すことができる。通常は、試料混合液を含む容器のサイドに磁石を置き、容器の壁に粒子を集め、試料の残りを捨てるだけで良い。

【0051】

例えば、EP-A-106873においてSintefが記載している様な超常磁性粒子が特に好適である。反応中に粒子が磁気によって凝集したり塊になったりするのを避けることができ、生物材料の均一な単離を確実にこなうことができるからである。本発明で使用するには、Dyna1 AS社(ノルウェーのオスロ)からDYNABEADSとして販売されている既知の磁気粒子が、特に好適である。

【0052】

本発明で使用する為に機能化されたコーティング粒子は、米国特許第4336173号、第4,459,378号、および第4,654,267号に記載されたビーズ修飾法によって調製することができる。即ち、ビーズまたは他の支持体は、例えば正または負に荷電したり、親水性または疎水性にする等、様々なタイプの機能化された表面を有する様、調製することができる。

【0053】

異なる表面および支持体に対し、様々な分子成分は、様々な程度の非特異的結合を示す。従って、結合条件を最適化し、例えば粒子濃度等、所定の系に最適な支持体の面積を決定する為には、単位体積当たりの固相支持体の量(例えば粒子の数)を「滴定」することが有利である。

【0054】

細胞試料、即ち、単離細胞または支持体に結合した細胞を溶解することにより、テロメラーゼ複合体を含む上記成分を遊離させる。細胞を溶解する方法は、当該技術分野において公知であり、文献中に広く記載されているので、公知の如何なる方法を使用しても良い。試料のタイプや細胞が異なれば、異なる方法を用いた方が適切であると考えられるが、標的成分の生物活性を維持する為には、適切

なバッファーおよび機械的溶解による適切な溶解法を使用することが重要である。

【0055】

本発明の方法を実施する為に、液体試料の遠心分離、生検針、頰側切屑等の如き何らかの方法で細胞を単離することができるが、好ましくは、本発明法では通常、固体支持体を用いて細胞を濃縮し、支持体に結合した細胞を、残りの試料部分から適宜採取または分離することにより、細胞を濃縮することができる。この様に細胞結合工程は、細胞を濃縮、及び／又は最初の試料よりも少量に濃縮する為に行なわれる。次に、所望の溶解剤を含む適切な溶解用バッファーを加えたり、単離した細胞を所望の溶解状態におくことにより、可溶化を適宜行なうことができる。例えば、適切な溶解剤を含む溶解用バッファーを単に加えるだけの場合には、単離した細胞を適切な時間、溶解用バッファー中でインキュベートし、例えば、テロメラーゼ等の標的成分の生物活性を破壊することなく可溶化が行なわれる様にすればよい。

【0056】

テロメラーゼ活性と原発癌の診断

これまでに、殆どすべてのタイプのヒト腫瘍におけるテロメラーゼ活性がスクリーニングされており、895種の悪性腫瘍を調べたうち759種(即ち85%)が上記酵素を発現していることが分かった(ShayとBacchetti, 1997)。この結果は、悪性腫瘍と非悪性腫瘍とを区別する為に利用できることを示している(Sommerfeldら、1996; Hiyamaら、1996b; Suginoら、1996; Kyoら、1997; Murakamiら、1997; Yoshidaら、1998)。

【0057】

いくつかの研究グループでは、テロメラーゼを診断マーカーとして用い、剥離性癌細胞を検出するという課題を解決すべく鋭意検討を行なっているが、どのグループも未だ、信頼できる方法を提示していない。診断マーカーとしてテロメラーゼ活性を用い、剥離性癌細胞を検索するときの重要な問題は、TRAPアッセイのインヒビターにより偽陰性が生じることである(Califanoら、1996; Mullerら、1996, 1998; Yoshidaら、1997a, b; Heineら、1998; Kavalierら、1998; Sumidaら

、1998)。最近まで、排尿中に存在する剥離性癌のテロメラーゼ活性を検出することは、PCRインヒビターが存在する為、厄介な問題であった(Mullerら、1996、1998; Heineら、1998)。しかしながら、上記問題は、遠心分離後、剥脱細胞を数回洗浄することにより、多かれ少なかれ克服されている(Yoshidaら、1997a, b; Kavalierら、1998)が、多量の細胞がロスするという手間のかかる操作である。

【0058】

最近、Murakamiら(1998)により、体腔液および子宮洗浄液から得られた癌細胞を濃縮する為の比較的有用なプロトコルが発表された。活性化リンパ球の存在により偽陽性が生じる恐れがあり、血液量が多いとPCRを阻害し、また、血液細胞成分のタンパク質が、癌細胞由来のタンパク質を稀釈してしまう恐れもある。従って、試料回収の過程で、血液成分と脂質成分の量を最小限に抑える必要がある。癌細胞の比率を高め、且つ、赤血球とリンパ球を取除く為に、リンホプレップ(Lymphoprep)と同様の原理に基づいた方法のナイコプレップNycoprep(Nycomed Pharma AS)を用いて癌細胞を単離した。しかしながら、濃縮処理における遠心分離工程で、テロメラーゼが不活性化されてしまい、回収できる癌細胞の数が減少することが観察された。これらの問題は、TRAPアッセイを行なう前に24~48時間細胞を培養することによって克服することができた。

【0059】

体液からの循環性癌細胞を濃縮する為に、上皮細胞に対する抗体で被覆した免疫磁気ビーズを加えた後、ビーズと細胞との複合体を洗浄すれば、血液、バクテリア、および捕捉した細胞から得られる他の非癌性細胞等の阻害物質を取除けるはずである。骨髓および末梢血内の生存乳癌細胞を濃縮して検出する為の免疫磁気分離技術をテストした実験では、癌細胞が70%の収率で3対数倍(3 log)に濃縮されることが示された(Borgnesら、1996; Naumeら、1997)。この知見によれば、このような癌細胞濃縮法の方が、前述した遠心分離に基づく方法(Murakamiら、1998; Yoshidaら、1997b; Kavalierら、1998)よりも優れていると信じるに足る充分な理由がある。リボ核タンパク質のテロメラーゼ複合体およびPCR増幅は、いずれも干渉因子に対する感受性が非常に強いので、テロメラーゼの酵素活性を検出する前にインヒビターとなり得るものを除去しておくことが、プロトコルの重要

な部分である。この工程は、ビーズの磁性を利用しながら、テロメラーゼに対する親和性を有するビーズを使用することによって簡素化される。濃縮された癌細胞を有するビーズ複合体、および捕捉されたテロメラーゼを有するビーズはいずれも容易に洗浄することができるので、この方法により、干渉因子を除去することができる。Murakamiら(1998)は、テロメラーゼ活性を伴う遠心分離の問題について記載しているが、癌細胞とテロメラーゼの免疫磁気分離法を用いれば、この問題を克服することができる。即ち、酵素によるテロメア伸長反応およびPCR増幅の前に干渉因子を取除く為、TRAPアッセイを行なう前に細胞を培養するという時間のかかる工程は不要となるのである。

【0060】

いくつかの独立した実験において、テロメラーゼの臨床への関連づけが示されている。報告された一つの事例では、膀胱の組織検査では肉眼的に観察し得る腫瘍はなかったが、同時に採取した膀胱洗浄液ではテロメラーゼ活性を示した。この患者の組織検査を繰返し行なったところ、4週間後に、小さな膀胱腫瘍の存在が明らかになった(Mullerら、1996)。別の事例では、スクリーニング用のコンピュータ断層写真撮影装置を用いて、膀胱癌であるとの診断を受ける19ヶ月前に、当該患者の尿液中でテロメラーゼ活性が検出された(Sueharaら、1998)。これら2つの事例は、増殖中の腫瘍が目に見える程大くなる前に、如何にして、当該主要の存在を、テロメラーゼの検出によって明らかにすることができるか、また、この様にして酵素活性を測定すれば、現在よりも早期に診断を行なうことができることを具体的に示している。

【0061】

通常、多くの癌診断で現在最も基準となっている検査は組織病理学検査であり、殆どの場合、疑いのある組織を生検することにより、正確な評価が得られる。従って、テロメラーゼアッセイ法の最も重要な臨床的利用法は、血液、骨髄、尿、痰、および胸膜におけるテロメラーゼの単離および検出(実施例9)によって示されているような、様々な洗浄液から得られる材料等、採取可能な体液による癌の診断であろう。細い生検針、頸部スミア、および糞便中の細胞解析も、原発癌の早期診断を改善するうえで有用である。

【0062】

テロメラーゼ活性による微小転移巣の検出

循環性微小転移巣を単離することは、癌の転移を証明するうえで重要な方法であることが知られている。早期の癌細胞、および血液中または骨髓液中の微小転移巣を検出することは、莫大な過剰量の正常細胞の中から数少ない癌細胞を検出するという問題を抱えている(Pelkeyら、1996)。循環性癌細胞を検出する為のマーカーとして、テロメラーゼ活性を用いるときの重要な問題は、TRAPアッセイのインヒビターによって偽陰性が生じるということである(Suginoら、1996、1997; Cunninghamら、1998; Yangら、1998)。末梢血細胞が大量に混入すると、目的とする標的細胞集団に由来するテロメラーゼが稀釈されてしまう恐れがあるが、このことが、偽陰性をもたらす原因の一つとなっている(Cunninghamら、1998)。胸膜滲出液中のテロメラーゼ活性の診断値を調べたところ、91.4%の感度および94.2%の特異性が得られた(Yangら、1998)。Murakamiら(1998)及びYangら(1998)は、滲出液試料中の白血球の存在に興味を抱いた。白血球の混入により偽陽性の結果が生じ得、TRAPアッセイの診断的価値を損なう恐れがある。

【0063】

血液中の微小転移巣を検出し、癌細胞の免疫磁気濃縮、及びテロメラーゼ活性の検出と組合せて行なうテロメラーゼの捕捉と一緒に実施例8に示した。いくつかの独立した実験では、正常細胞100万個当たり癌細胞2~3個という感度が示されたが、これは、本発明法の感度と信頼度の両方を実証するものである。臨床材料について同じプロトコールを試験したところ、乳癌患者からの胸膜における微小転移巣細胞が検出された(図11)。テロメラーゼ活性は、主にビーズ画分に見られたが、残りの溶解物中にもいくらかの活性が見られた。この結果は、ビーズが捕捉できるよりも多量のテロメラーゼ複合体が試料中に存在することにより、説明することができる。

【0064】

本発明は、微小転移巣を検出する新規の方法について記載している。即ち、免疫磁気単離プロトコールに従って循環性癌細胞を濃縮し(Bosnesら、1997)、テロメラーゼを単離してから、TRAPアッセイを用いて検出を行なった(Kimら、1994)

。免疫磁気単離法もTRAPアッセイ法も、分子生物学では認められている方法であるが、これら2つの方法を組み合わせることは、これまで記載されていない。循環性癌細胞の濃縮とテロメラーゼの単離とを、酵素活性の検出と組み合わせることにより、テロメラーゼを診断マーカーおよび予後マーカーとして使用することが可能となる。

【0065】

要約すれば、本発明は、テロメラーゼ検出の改良方法、更には、上記方法を如何にして、テロメラーゼを検出する前に細胞選別を行なうことによって目的の細胞を標的する方法と組み合わせるかについて記載している。この一例として、血液中または骨髄中を循環性癌細胞を積極的に選別する方法と、テロメラーゼを検出する方法を組合せた方法が挙げられる。

【0066】

本発明では、以下の方法が提供される。

【0067】

固相、および好ましくは磁気ビーズを用い、細胞粗製溶解物からテロメラーゼ複合体を単離することによってテロメラーゼを検出する方法。

【0068】

標的細胞を積極的に濃縮するか、テロメラーゼ受容幹細胞の如き望ましくない細胞を減少させることによって、または、目的とする細胞だけを標的とする為に、積極的な濃縮法と消極的な濃縮法とアッセイを妨害する細胞の除去を組合わせて標的細胞中のテロメラーゼを検出する方法。

【0069】

テロメラーゼの単離と、テロメラーゼRNA等のテロメラーゼサブユニットの検出を組み合わせることによって、テロメラーゼを検出する方法。この方法では、テロメラーゼ複合体で統合された (integrated) 成分のみ検出され、細胞中に遊離しているサブユニットは検出されない。

【0070】

テロメラーゼ複合体による細胞の精製とテロメラーゼの検出とを組み合わせることによって、体液中または糞便中の原発癌細胞を簡易且つ確実に検出する方法。

【0071】

実施例1:テロメア反復配列アッセイプロトコール-TRAPアッセイ法

希少な細胞を用いて臨床試料中のテロメラーゼ活性を検出するには、感度の高いアッセイ法が必要となる。本実施例の目的は、放射性標識は全く使わずにテロメア反復配列アッセイ法の感度を測定することであった。その為に、細胞数を40個から1000個まで増やしながら一連の試料を作製した。オリジナルのTRAPezeプロトコール(オンコー社)に従って、夫々の場合についてテロメラーゼ活性-TRAPアッセイを測定した(図3)。

【0072】

方法

上皮由来のSW480培養細胞をPBSで2回洗浄してから、4℃で10分間、600×gで遠心分離を行なって回収した。

【0073】

上清を捨て、細胞を20 μ lのCHAPS溶解用バッファーで溶解し、氷浴上で25~30分間インキュベートした。

【0074】

テロメラーゼアッセイの為に、次の混合液を調製した:

10× TRAPバッファー	5 μ l
50(dNTP混合液	1 μ l
TSプライマー	1 μ l
TRAPプライマー混合液	1 μ l
Taqポリメラーゼ	2ユニット
細胞溶解物	X μ l
全量50 μ l	

この混合液を、TSプライマーをテロメラーゼによって伸長させる為に30℃で30分間インキュベートした。

【0075】

伸長した後、そのまま続いて増幅処理を行ない、94℃で90秒、その後、94℃で30秒間、60℃で30秒間を30回繰り返した。

【0076】

12.5%のアクリルアミドゲル上で電気泳動して、PCR産物を分離する。

【0077】

1×CHAPS溶解用バッファー:

0.5% CHAPS

10% グリセロール

10mM トリス塩酸pH7.5

1mM $MgCl_2$

1mM EGTA

5mM β -メルカプトエタノール

0.1mM ベンズアミジン

TRAP反応混合液:

20mM トリス塩酸pH8.3

1.5mM $MgCl_2$

63mM KCl

0.05% Tween20

1mM EGTA

50 μ M dNTPs

2 μ Ci 32 P-dCTPおよび 32 P-TTP

10×TRAP反応バッファー

200mM トリス塩酸pH8.3

0.1 μ g TSオリゴヌクレオチド

0.5 μ M T4遺伝子32タンパク質(USB)

(1 μ g)

15mM $MgCl_2$

2ユニット Taqポリメラーゼ

630mM KCl

0.5% Tween20

10mM EGTA

0.1% ウシ血清アルブミン(BSA)

50×dNTP混合液=dATP、dTTP、dGTP、dCTPが夫々2.5 mM

図3は、このテロメラーゼ活性検出法の為にオリゴヌクレオチドを放射性標識しなかったときの検出限界は、およそ40~50個のくらいのSW480細胞であることを示している。本実施例において、予想したほどのテロメラーゼ活性を示さなかった100細胞の試料を除けば、細胞数が増すにつれてテロメラーゼ陽性のバンドの強度が増す。TRAPEzeキットの製造業者(オンコー社、米国)は、彼らの資料の中で、80個のテロメラーゼ陽性細胞の抽出物におけるテロメラーゼ活性を示している。

【0078】

実施例2:磁気ビーズによるテロメラーゼ活性の単離

本実験では、テロメラーゼアッセイを行なう前に、培養癌細胞を抗体被覆ビーズと結合させた(TRAPEzeキット、オンコー社、米国)。これは、細胞株SW480が、ビーズ上のBerEP4抗体によって抗上皮ダイナビーズに結合する為、細胞の免疫磁気分離をシミュレートした。磁気ビーズ上に捕捉された細胞を可溶化し、ビーズを溶解物から分離した。ビーズ画分と残りの溶解物についてテロメラーゼ活性を調べた。

【0079】

方法

SW480培養細胞1000個をPBSで2回洗浄してから、4℃で10分間、600gで回収し、氷冷した洗浄用バッファーに懸濁して、再び遠心した。異なったタイプの磁気ビーズ(ダイナビーズ)、抗体被覆ダイナビーズM-450または抗体被覆ダイナビーズM-280を用いた。この実験では、ダイナビーズ抗上皮細胞(M-280)を用いた。これらのビーズを細胞に加えてから、20 μ lの氷冷CHAPS溶解用バッファーに懸濁した。ダイナルMPC-Eを用いて、チューブの壁に磁気ビーズを集める前に、氷浴上で25~30分間インキュベートした。溶解物を新しいチューブに移して、ビーズを40 μ lの氷冷CHAPS溶解用バッファーに懸濁した。

【0080】

テロメラーゼアッセイを行う為に、実施例1に記載されている通りに混合液を調製した。

【0081】

TSプライマーをテロメラーゼによって伸長させる為に30℃で30分間インキュベートした。

【0082】

伸長した後、引き続き増幅処理を行ない、94℃で90秒、その後、94℃で30秒間、60℃で30秒間を30回繰り返した。

【0083】

12.5%のアクリルアミドゲルによる電気泳動で、PCR産物を分離した。

【0084】

結果

同じ量のテロメラーゼ陽性SW480細胞(1000個)を磁気ビーズ(ダイナビーズM-280抗上皮細胞)存在下で溶解した。ただし、100万、1000万または2000万個の磁気ビーズを用いた。TRAPアッセイの前に、磁石をチューブ(Dyna1 MPC-E)の壁につけて使用することによって試料からビーズを取除き、溶解物を新しいチューブに移した。このビーズをCHAPS溶解用バッファーに懸濁した。図4に示す様に、ビーズ画分と、残りの溶解物の両者のテロメラーゼ活性を調べた。陽性のテロメラーゼシグナルは、ビーズ画分でのみ見られ、最も良好な結果は、2000万個のビーズを用いたときに得られた。

【0085】

結論

本発明者らは、TRAPeze溶解用バッファーで細胞を溶解すると、テロメラーゼ複合体は、直接的または間接的に、驚くほどよく磁気ビーズに結合すると結論づけた。テロメラーゼアッセイ法の前に磁気ビーズを除去すると、活性は検出されなかった(結果は示していない)。テロメラーゼを磁気ビーズ上に捕捉すると、酵素複合体の生物活性は破壊されなかった。このことは、磁気ビーズを用いてテロメラーゼを単離することによって、テロメラーゼ活性を調べることができ、TRAP試験の前にインヒビターを含む溶解物を除去できることを意味する。テロメラーゼ複合体の捕捉は、1000個のSW480培養細胞を用い、2000万個のダイナビーズ(300 μ g)を用いたときに最も良好な結果が得られた。

【0086】

実施例3:ダイナビーズDNA DIRECTを用いたテロメラーゼ複合体の単離

実施例2では、抗体被覆磁気ビーズを用いてテロメラーゼを単離した。本実施例では、溶解物からゲノムDNAを直接単離する為に設計された非被覆ダイナビーズを用いた。さまざまな量のダイナビーズDNA DIRECT(ノルウェー、オスロ、ダイナル社)を用いて、2000個のSW480細胞からテロメラーゼ活性を単離した。実施例2と同じ方法を用いた。

【0087】

結論

DNA単離に通常用いられる非被覆磁気ビーズによって、細胞溶解物からテロメラーゼ複合体を単離することができる。2000個の細胞に対して、テロメラーゼ単離に用いるDNA DIRECTビーズの最適量は2000~3000万個または300~450 μ gの間である。

【0088】

実施例4:非被覆エポキシドビーズによるテロメラーゼの単離

本実施例では、溶解物中のテロメラーゼとの結合について、表面にエポキシドポリマーを有する非被覆ダイナビーズを調べた。これらのビーズは、実際に抗体被覆ビーズを作製する為に用いられているので、抗体なしのビーズが、テロメラーゼ複合体を単離する為に使用できるか否かを調べることが目的であった。2,000個の細胞を、さまざまな量のエポキシドビーズ(4.5 μ mのダイナビーズを150~400 μ gの範囲で)と共に、40 μ lの1 \times CHAPS溶解用バッファーで溶解した。氷浴上で30分間インキュベートした後、溶解物からビーズを分離し、実施例2の記載に従い、TRAP混合液を加える前に40 μ lの溶解用バッファーに再懸濁した。

【0089】

図6は、ビーズが200 μ gから400 μ gの範囲にあるとき、TRAPアッセイにおけるPCR産物のシグナル強度がどの程度まで概ね一致しているかを示している。100 μ gのビーズを用いたレーンのシグナル強度は予想されたほど強くはなかったが、これは、おそらく、この実験で単離をしている間に細胞が失われたせいであろう。

【0090】

結論

本実施例では、200 μ g以上のビーズを用いたとき、すべてのテロメラーゼ複合体がビーズに結合したことを示している。或いは、200 μ g以上のビーズを用いると、十分なテロメラーゼが単離され、それによって、PCRを飽和させるのに十分なテンプレートが産生されることを説明している。テロメラーゼ活性が比較的高い細胞を用いて、ただし、大まかにいえば、細胞当たり最低でもおよそ0.1 μ gのエポキシドダイナビーズを用いているはずであるが、強力なTRAPアッセイPCRシグナルを生じさせるのに必要な、全量または十分な量のテロメラーゼ複合体が単離されることを確認した。後の実施例では、400 μ gの磁気ビーズを用いた。

【0091】

実施例5:テロメラーゼは、DNAへの結合によって間接的に単離されるのか。

【0092】

テロメラーゼ複合体が固相に結合するメカニズムに関する元々の仮説は、染色体DNAを介して間接的に結合するというもの、すなわち、ビーズが、テロメラーゼ複合体とともにクロマチン構造の一部として、ゲノムDNAにクロマチンの形で結合するというものである。この仮説を確認する為、磁気ビーズから溶出した物質及び溶解物画分から精製した物質にゲノムDNAが存在するかを、PCR増幅によって調べた。

【0093】

方法

テロメラーゼ複合体を単離する為の実施例2のプロトコールを用いた。本実施例では、実施例4と同じ方法で非被覆エポキシドダイナビーズを用いた。さまざまな量のSW480細胞を調べた。各ビーズ画分を40 μ lの水に再懸濁し、磁気ビーズに結合した成分を溶出する為に65℃で5分間インキュベートした。残った溶解物については、ドイツのキアゲン社(Qiagen)から市販されているキットであるQIAamp血液キットとその推奨プロトコールを用いてゲノムDNAを単離した。

【0094】

結果

ビーズ画分を調べたところ(図7)、出発材料として100個から100,000個の細胞を用いた一連の試料では、GAPDH遺伝子のPCR産物を生成することができなかった。しかし、残った溶解物からの材料を試験すると、すべての試料で陽性のPCRシグナルが見られた。

【0095】

結論

ビーズ画分を調べたレーンではシグナルが見られず、残った溶解物を調べたときに陽性のシグナルが見られたことは、染色体DNAはビーズに結合せず、溶解物に残っていることを証明しているにちがいない。これらの結果は、染色体DNAがビーズに結合しても、テロメラーゼ複合体は単離されないことを示している。染

色体DNAを介して間接的にテロメラーゼが結合するという仮説は、こうして否定された。

【0096】

実施例6:固相テロメラーゼ単離のメカニズム:タンパク質およびタンパク質-RNA複合体の磁気ビーズに対する非特異的結合

タンパク質またはタンパク質-RNA複合体の磁気ビーズに対する非特異的結合によってテロメラーゼが単離される、というのが、どの様にしてテロメラーゼが磁気ビーズによって単離できるのかというメカニズムを説明する為に提案した次の仮説である。実施例2で記載したプロトコールに従い、SW480細胞を出発材料に用いて、テロメラーゼ複合体を単離した。ビーズから熱溶出した後、タンパク質を分離して、SDS-PAGEとそれに続く銀染色を用いて可視化した。

【0097】

方法

磁気ビーズに結合するタンパク質を解析する為に、以下のプロトコールを用いた。PBSに再懸濁した300 μ gのダイナビーズ抗上皮細胞を、SW480細胞の懸濁液に加えた。0.1% BSAを含むPBSによって全容量を1 mlに調整し、完全に混合する為、4℃で約15分間、ローラーの上に載せておいた。チューブをMPCに2分間置き、ビーズ/細胞複合体をチューブ壁に移動させた。上清を取り出して捨てた。

【0098】

チューブを65℃の環境下に5分間置き、ビーズからビーズに結合した成分を溶出した。再びチューブを磁石の中に入れてビーズを集め、溶出液を移した。チューブをMPCから取り出して、1 mlのPBSを加えて、ビーズと細胞の複合体を再懸濁した。細胞が付着したビーズを再び磁石で集めて、洗浄を2回繰り返した。再懸濁したビーズと細胞の複合体をきれいなチューブに移してから、最後の洗浄を行う為にMPCに入れた。

【0099】

100 μ gの非被覆エポキシドビーズを40 μ lの1 \times CHAPS溶解用バッファーと混合した後、ピペッティングによって、ビーズと細胞の複合体と混合した。チューブを氷上で30分間インキュベート、完全に溶解した。

【0100】

磁石を用いてビーズを集め、ビーズ画分を $10\mu\text{l}$ の 10 mM トリス塩酸で懸濁した。

【0101】

ファストシステム(PhastSystem)(スウェーデン、ファルマシアバイオテックAB社)は、分子量を測定し、ポリペプチドを解析する為のSDS-PAGEシステムである。ゲルにロードする前に、 $2\mu\text{l}$ の $5\times\text{Red}$ バッファーを各溶出物 $8\mu\text{l}$ に加えた。タンパク質を変性する為に、この混合液を含むチューブを 100°C の環境下に5分間置いた。この段階で、SDSと β -メルカプトエタノールを添加することにより、タンパク質は、各ポリペプチドサブユニットに解離した。チューブは、サンプルをゲルにロードするまで氷浴上に保存した。タンパク質は、定電圧および一定のpHで電気泳動を行ない、 $10\sim 15\%$ の勾配(gradient)ゲル上で分離した。

【0102】

ゲル上のタンパク質を可視化する為にファストゲルシルバーキット(PhastGel Silver Kit)(スウェーデン、ファルマシアバイオテックAB社))を用いた。銀染色を用いれば、タンパク質の濃度が $0.3\sim 0.5\text{ ng}/\mu\text{l}$ と低くても検出することができる(HeukenshovenおよびDemick, 1988)。

【0103】

タンパク質は、重量単位ではほぼ同量のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)と結合し、全体として負電荷を帯びる様になる為、タンパク質の固有の電荷は無視できる。更にSDSが結合すると、本来のタンパク質の立体構造が変化し、ほとんどのタンパク質が同じような形になると考えられる為、質量に対する電荷の比率が同じになる。従って、分離は、ポリペプチドの分子量のみに依存することになる。電気泳動を開始する時には、タンパク質の移動度は、ポリアクリルアミドゲルによる影響を比較的受け難い。タンパク質が勾配ゲルの界面に到達すると、孔径が突然小さくなる為、それらの移動度は劇的に鈍くなり、移動界面が急速にタンパク質から離れて行く。タンパク質は、定電圧および一定のpHで離れながら移動する。タンパク質は勾配ゲル($10\sim 15\%$)を通過して移動しながら、そのサイズに応じて分かれて行く。

【0104】

結果

本実施例によって、ビーズの表面が弱い正電荷を帯びている為にタンパク質がエポキシドビーズに結合するという事実が確認された。テロメラーゼの触媒成分であるhTERTに対する既知の抗体は今のところ存在しない為、hTERTが存在すると結論づけることはできなかった。テロメラーゼのタンパク質成分(hTERT)は、127 kDaという分子量をもっている(Nakamuraら、1997; Meyersonら、1997)。図8はこのサイズのタンパク質を示しているので、この結果により、hTERTがビーズに結合しているタンパク質の一つであるという仮説が裏付けられた。従って、本実施例の結論として最も可能性が高いのは、タンパク質-RNAテロメラーゼ複合体が磁気ビーズに非特異的に結合するというものである。

【0105】

実施例7:固相テロメラーゼ単離法の感度と信頼性

本実施例は、試料中の細胞量が少量しかないとときでも、この方法が如何に信頼できるかを明らかにしている。テロメラーゼを単離する為のプロトコール(実施例2)に従って、50個の細胞を夫々平行して用いたが、これは、開発した方法の検出限界に近かった為である(実施例1)。

【0106】

結論

試料中に50個の細胞しかなくても、5個の試料すべてにおいて、テロメラーゼ活性について陽性の結果が得られた。これは、本研究で開発した方法の感度と信頼性のいずれもが優れていることを示している。

【0107】

実施例8:微小転移巣細胞におけるテロメラーゼ活性の検出

血液または骨髄における幹細胞やリンパ球等のバックグラウンドとなる細胞による干渉を受けることなしに、標的細胞におけるテロメラーゼ活性を測定する為には、テロメラーゼ測定を行なう前に細胞を選別するという解決法がある。これは例えば、上皮細胞に共通のエピトープに対するBerEP4のような細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体を用いて、目的とする細胞を単離して行なうことが

できる。或いは、例えば、CD2に対する抗体で被覆した磁気ビーズを用いてTリンパ球を除去する等、結果に悪影響を及ぼす恐れのある細胞は、枯渇(depletion)させることによって取除くことができる。積極的選抜または標的細胞と、好ましくない細胞の枯渇を併用して用いることによって、非常にきれいな細胞集団を得ることができる(Neuraurer, A.ら、1998)。

【0108】

本実施例では、テロメラーゼ単離およびその後のTRAPアッセイと組合わされる癌細胞濃縮法の使用について示す。血液中の癌細胞は、血液中の有核白血球と比べると非常に数が少なく、正常細胞100万個当たり癌細胞1個かそれよりも少ないものである。この様なアッセイ感度を得る為には、癌細胞は「正常でない」部位にあるという事実を利用することによって、癌細胞の積極的な選抜を行なうことができる。腫瘍は、癌の主要なグループであって、上皮細胞から生じる。上皮細胞は、癌性型であっても、ある種の共通上皮細胞マーカーを発現する。このような上皮細胞マーカー(例えば、BerEP4)に対する抗体を用い、この抗体を磁気ビーズのような固相にカップリングさせることによって、上皮細胞を単離/濃縮することができる(Hardinghamら、1993, 1995; Borgnesら、1996, Naumeら、1997)。本発明者らは、約70%の回収率で癌細胞を3対数倍(3 log) にまで濃縮した。

【0109】

テストした末梢血細胞(PBL)では、1000細胞の124試料のうちいずれもテロメラーゼ陽性と判定されなかった。しかし、10,000細胞または100,000細胞を用いれば、夫々124種類のうち55種および100種と、多くの試料が陽性と判定された(Shay及びWright, 1996)。このことは、血液試料中の99.9%の正常細胞を除去することによって、この様な問題を解消できることを示唆している。

【0110】

方法

既知の量の培養細胞(SW480)をPBSで2回洗浄してから、4℃で10分間、600gでペレット化し、氷冷した洗浄用バッファーに再懸濁し、再度ペレット化した。SW480細胞を5 mlの血液試料(およそ2000万個の有核白血球)の中に打ち込んだ。

【0111】

2000万個のダイナビーズ抗上皮細胞($300\mu\text{g}$)を試料に加え(打ち込まれた血液試料と打ち込まれていない血液試料)、回転ミキサーを用い、 4°C で30分間連続して混合した。磁石(Dyna1 MPC-Q)を用いて、捕捉した細胞を集め、PBSで3回洗浄した。 $60\mu\text{g}$ のダイナビーズDNA DIRECT($2.8\mu\text{m}$ のビーズ400万個)を含む $25\mu\text{l}$ のCHAPS溶解用バッファーを、捕捉した細胞を有する磁気ビーズ画分に加えた。氷浴上で25~30分間インキュベートしてから、MPC-Eによってチューブの壁にすべての磁気ビーズを集めた。溶解物を捨て、ビーズを氷冷した $40\mu\text{l}$ のCHAPS溶解用バッファーに再懸濁した。

【0112】

テロメラーゼアッセイを行なう為、実施例1の記載に従って混合液を調製した。

【0113】

TSプライマーをテロメラーゼによって伸長させる為、 30°C で30分間インキュベーションした。

【0114】

伸長に引続いて増幅処理を行ない、 94°C で30秒間、 60°C で30秒間を30回繰返した。

【0115】

12.5%のアクリルアミドゲル上での電気泳動によるPCR産物を分離した。

【0116】

結果

固定した癌細胞をCHAPS溶解用バッファーで溶解し、磁石でビーズを集めて、テロメラーゼ複合体を単離した。本発明者らは、本実施例において、免疫磁気ビーズと非被覆ビーズとを併用した。溶解物を除去したところ、試験したすべての場合に陰性であることが分かった。そこで本発明者らは、実施例2の記載に従って、ルーチンのビーズ画分だけを調べた。本発明者らによる、循環性癌細胞を磁気ビーズによって単離する為のプロトコールに従ったところ、正常な血液試料(打ち込んでいない)では活性が見られなかった(図10、レーン1)。テロメラーゼ活性を有することを証明する弱いシグナルが、40個の癌細胞を含む血液試料中で

見られた(レーン2)。50個から500個の癌細胞を含む血液試料中では、強いシグナルが見られた(レーン3~6)。陽性対照と陰性対照は予想通りであった(レーン7~8)。レーン1にシグナルが見られないことから、癌細胞を濃縮する本発明法によって、幹細胞やリンパ球の様にテロメラーゼ活性を有する他の細胞が充分除去されていることが分かる。

【0117】

結論

本発明者らは、血液1 ml当たり癌細胞10個、または正常細胞100万個当たり癌細胞2~3個というアッセイ感度を実証した。これは、サイトケラチン19mRNAのネステッド (nested) RT-PCRと組合わせた免疫磁気濃縮法を用いる微小転移巣検出で示された感度と同じ感度である(Borgnesら、1996)。後者のアッセイ法により、血液中に上皮細胞が存在することが証明されるものの、これが癌細胞なのか、正常な上皮細胞なのかは証明されておらず、また、この検査は予後的な価値を有していない。テロメラーゼアッセイ法を用いる利点は、診断的な価値と、恐らく予後的な価値があり得ること、及びコンタミネーションのリスクに関して問題の多いことで知られるネステッドRT-PCRを回避できることである。

【0118】

実施例9:胸膜中の微小転移巣細胞の検出

上記の実施例はすべて、モデル系で行われたものであり、様々な方法のパラメータについて調べた。従って、乳癌患者から採取した試料について、開発した方法を試験したときは、非常に胸を躍らせた。

【0119】

方法

本実施例で検査した12.5 mlの胸膜試料中には、テロメラーゼも低量発現している600万個のリンパ球が入っていた(Blascoら、1995; Hiyama K.ら、1995; Chiuraら、1996)。この患者は、胸膜中に循環性癌細胞を保有している可能性が高かった(Gunnar Kvalheim博士からの私信)が、癌細胞の量は分からなかった。実施例8と同様に、癌細胞を濃縮する為に2000万個のダイナビーズ抗上皮細胞を加えた。ダイナビーズ抗上皮細胞では捕捉できないテロメラーゼ発現リンパ球癌細胞の存

在を明らかにする為に、胸膜に残っている細胞を400 μ gのエポキシドビーズ入りの1×CHAPS溶解用バッファーで溶解した。実施例2及び8に記載されているプロトコールに従った。

【0120】

結果

図11は、胸膜の濃縮細胞集団中でテロメラーゼが検出されたことを示している。この濃縮集団の溶解画分にもいくつかの活性が見られたが、それは、添加したビーズの数が、この強力なテロメラーゼ活性に対して少な過ぎたことを示すものである。

【0121】

結論

本実施例により、癌細胞を単離した後にテロメラーゼ活性を検出する方法が、モデル系で試験したときと同様、実際の試料で試験したときにも機能することが明らかになった。

【0122】

実施例10:微小癌組織転移検出の為に、テロメラーゼアッセイ法とCK19アッセイ法の併用

微小癌組織転移を検出する為に現在用いられている技術は、顕微鏡による癌細胞の検出に基づいている。この検出は、癌細胞を選択的に染色することによってより簡便に行われ、また、正常でない場所に細胞が存在することによって可能となる。例えば、血液または骨髄で見られる癌細胞のサイトケラチンを染色する。また、mRNAを単離した後、癌細胞で大なり小なり特異的に発現している遺伝子を増幅することによっても可能である。

【0123】

顕微鏡法及びmRNA法のいずれも、正常細胞を枯渇させるか、癌細胞を積極的に選抜して癌細胞を多くする（濃縮する）ことによって実際に利用可能となる(Hardinghamら、1993, 1995; Eatonら、1997; Naumeら、1997; Lyckeら、1997)。しかしながら、これらの方法は全て、多かれ少なかれ、例えば上皮由来の癌細胞が血液または骨髄に存在する等、「正常でない」場所にある癌細胞は検出可能であ

る、ということに基づいている。

【0124】

サイトケラチン19(CK-19)は、mRNA法を用いた微小転移巣検出法に使用されるマーカーの一つである。循環性癌細胞の免疫磁気による濃縮法と、mRNAの単離およびその転写産物のネステッドRT-PCRとを併用すると、特異性の程度が高く、且つ感度の高い方法となる。

【0125】

TRAPアッセイ法を用いて、最も特異的な癌マーカーの一つであることが知られているテロメラーゼの酵素活性を検出することができる(実施例1)。磁気ポリマービーズを用いれば、そのままの状態でテロメラーゼ複合体を単離することができ、循環性癌細胞の濃縮に使用できるという知見(実施例2と8)により、テロメラーゼ検出法は改善された。この方法により、テロメラーゼアッセイを阻害する可能性のある因子を取除くことが、一層簡便になる。

【0126】

偽陽性の結果となる恐れがある為、RT-PCRを診断に使用することには問題がある。細胞を免疫磁気濃縮しないと、微小癌組織転移細胞の検出に用いられる分子マーカー、例えばCK-19が、正常な試料に検出される場合がある。しかしながら、血液試料から癌細胞が濃縮されたとしても、偽陽性の問題をもたらす可能性がある。血液や骨髄を採取するときに針が皮膚を貫通すると、正常な上皮細胞が含まれる可能性がある。免疫磁気ビーズを加えると、これらの正常細胞は、上皮由来の癌細胞として選抜されてしまうだろう。CK-19の如く、癌細胞に特異的でないmRNA転写産物を用いると、血液試料に正常な上皮細胞が混入していれば、それがRT-PCR法で増幅され、たとえ循環性癌細胞が存在していなくても陽性の結果が生じてしまう。

【0127】

表2は、微小転移巣の検出に最も汎用されている方法を比較したものである。どの方法も感度は高いが、テロメラーゼ活性の測定に基づく検出法は、生存細胞を必要とする唯一の方法である。

【0128】

【表2】

微小転移巣の検出法			
	免疫組織学	RT-PCR	テロメラーゼ
感度	高い	1:10 ⁶ の細胞	2:10 ⁶ の細胞
生細胞	生細胞である必要なし	生細胞である必要なし	生細胞
主な短所	時間がかかる	偽陽性	偽陰性

【0129】

テロメラーゼ活性の発現は、ある種の幹細胞(Wrightら、1996; Harle-Bachorら、1996; Ramirezら、1997; Kyoら、1997; Burgerら、1997)、造血細胞(Brocchiら、1995; Hyuama, K.ら、1995)、および腫瘍細胞(Kimら、1994; ShayとBaccetti, 1997)にのみ見られる生物学的現象である。この特異的な発現パターンを利用すれば、テロメラーゼ陰性の正常上皮細胞の混入を考慮することなく、循環性癌腫を検出することができる。細胞の免疫磁気濃縮を用いれば、テロメラーゼ発現リンパ球の混入も回避できる。

【0130】

TRAPアッセイにより酵素活性を測定するということは、この方法が、当該酵素を発現する細胞がそのまま存在することに依存していることを意味する。従って、TRAPアッセイは、死んだ腫瘍細胞に対立するものとして、生存細胞の優れた指標となる。進行した癌の治療により、死んだ腫瘍細胞から大量のDNAが放出されることから、これは重要である。放出されたDNA断片は、宿主から一掃されるまで長期間、体腔または循環器に残留することがあるので、ゲノムDNAにおける腫瘍特異的な分子遺伝学的変化を標的とする試験結果の解釈を混乱させる可能性があると考えられる。テロメラーゼは、室温では珍しいほど安定しているので、標本採取の際に特殊な処置或いは迅速な処置を行う必要がない(Gugganら、1998)。1日経過した胸膜試料を検査しても、テロメラーゼ活性の検出に何ら問題がなかったことから、この結果が確認された。1日経過した胸膜試料を、患者から採取したその日に検査した新鮮な試料と比較したところ、差は見られなかった(データは示さない)。

【0131】

循環性癌細胞の濃縮と、その後の、正常細胞にのみ発現する酵素の単離および検出とを組み合わせるという方法は、CK-19をプライマーとして用いた顕微鏡法およびmRNA法の両方と比較しても、微小転移巣を検出する為の強力な方法となるはずである。この新しい方法によって、苛酷な作業を強いる顕微鏡の使用は減少するか省略することが可能となり、干渉因子が存在する為に生じる人工産物の可能性を低減し得るはずである。

【0132】

しかしながら、mRNA法とテロメラーゼ法を併用すると、図12に示す様に、微小転移巣細胞を検出するときの信頼性が高まる。図12は、CK-19をマーカーとして、TRAPアッセイによるテロメラーゼ単離法と、溶解物からのmRNA単離の併用法を示している。TRAPアッセイを行う前に干渉因子を取除き、通常通りに、テロメラーゼ活性を検出する為にビーズ画分を使用することができる。CK-19に特異的なプライマーを用いて、ポリアデニル化mRNAを単離する為にオリゴdTビーズを溶解物に加えて、循環性癌細胞を検出することができる。こうすれば、いずれも非常に感度の良好な2つの独立した検査法により、同一試料に対し、高い信頼度をもって微小癌組織転移診断を行なうことができる。

【0133】

実施例11:テロメラーゼRNA増幅法を併用したテロメラーゼ複合体単離法

鋳型となるヒト遺伝子で、RNA成分がクロニングされている(Fengら、1995)。テロメラーゼRNAの発現は、テロメラーゼに対し、高い陽性反応を示す細胞では上方制御されることが分かっているが、その発現はテロメラーゼ活性とは相関しない(Avilonら、1996; Blascoら、1996)。テロメラーゼ活性のない細胞においてテロメラーゼRNAが存在することは、RNA成分が過剰であること、または不活性化されたテロメラーゼ複合体が存在することを示しているのかもしれない。この為、RNA成分を治療に使用することは容易なことではなく、今のところ、癌を予測できるとは考えられていない。テロメラーゼRNAは、ヒトではポリアデニル化されていない為、この成分を検出するには、従来からの全RNA単離法が用いられる。

【0134】

本発明者らは、本明細書に記載した方法に従い、RNA成分を診断手段として使用できると考えている。テロメラーゼ複合体は磁気ビーズによって単離することができる為、RNA成分も複合体そのものの中に組込まれている。しかしながら、遊離したRNA成分は、この方法で単離することはできない。本発明者らは、テロメラーゼ複合体単離法とRT-PCRによるRNA成分の増幅法とを組み合わせることによって、陽性シグナルが、テロメラーゼ活性と相関する様になると考えている。

【0135】

方法

磁気ビーズを使用した細胞の試料調製または使用しない細胞の試料調製

磁気ビーズを含むCHAPS溶解用バッファーまたは同等のバッファー中での細胞可溶化。

【0136】

磁石(Dyna1 MPC)を用いて、磁気ビーズに固定したテロメラーゼ複合体を回収。

【0137】

残った溶解物の除去、またRNA成分のRT-PCRを行なう前に数回ビーズ画分を洗浄してもよい。RT-PCRを行なう前のRNA単離処理によって、RNA成分を複合体から単離することができる。

【0138】

以下のプライマーを用いたテロメラーゼRNA成分hTRのRT-PCR

5'-TCTAACCCCTAACTGAGAAGGGCGTAG-3'

5'-GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGGAAG-3'

94℃で45秒間、55℃で45秒間、72℃で90秒間のサイクル

【0139】

【表3】

ヒトテロメラーゼ RNA:

```

10      20      30      40      50      60      70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GGGUUGCGGAGGGUGGGCCUGGGAGGGGUGGUGGCCAUUUUUUGUCUAACCCUAACUGAGAAGGGCGUAG 70
GCGCCGUGCUTUUUGCUCCCCGCGCGCUGUUUUUCUCGCUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUG 140
CCGCCUUCACCGUUCAUUCUAGAGCAAACAACAAAAAUGUCAGCUGCUGGCCCGUUCGCCUCCCCGGGGACC 210
UGCGGCGGGUGCGCCUGCCAGCCCCGAACCCCGCCUGGAGCCGCGGUCGGCCCGGGGCUUCUCGGGAGG 280
CACCCACUGCCACCGGAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCCGGGUCUCUCGGGGGCGAGGGCGAGGUUCAC 350
CGUUUCAGGCCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGUCCCGCCGCGGCGGAUUCUGAGCUGUGGGACGUG 420
CACCCAGGACUCGGCUCACACAUGCAGUUCGUUUCCUGUUGGUGGGGGGAACGCCGAUCGUGCGCAUCC 490
          *3'末端

```

ド線部は PCR-プライマー

【0140】

実施例12:テロメラーゼアッセイ法を併用した排出物からの結腸細胞の単離法
 癌の検査結果が出た症例の60%において、結腸切除検体から得られた管腔洗浄
 液でテロメラーゼ活性が検出されたが、大腸炎疾患の場合には検出されなかった
 ことから、これは、結腸癌腫を検出する為の優れたマーカーになることを示唆し
 ている(Yoshidaら、1997a)。しかしながら、この方法を非常に有用な診断検査法
 にする為の非侵襲的な方法がない。最近では、大便から細胞を単離する方法が開
 発され、特許されている(O'Neill, 1995)。この方法は、a)便のゲルが凍結する
 温度より低くなるまで便を冷却する工程、およびb)便を実質的にそのままの状態
 に保ちながら、免疫磁気ビーズを用いて細胞を取出す工程を有している。或いは
 、結腸洗浄液から、これも免疫磁気法によって、剥離細胞を捕捉することができ
 る。免疫磁気法で単離された細胞を、過剰量の磁気ビーズ存在下で溶解し、テロ
 メラーゼ複合体を捕捉する。磁石を用いて、テロメラーゼ複合体を濃縮し、残り
 の溶解物を捨てる。この様にしてTRAPアッセイまたはRNA成分を増幅すれば、テ
 ロメラーゼ活性を測定することができる。この方法の利点の一つは、大便試料か
 らの阻害物質をテロメラーゼ測定の前に除去できることである。

【0141】

方法

大便試料を、密閉して氷水中に入れて置いた回収バッグの中に直接入れる。少なくとも30分間冷却する。

【0142】

大便に、最小必須イーグル培地(MEM)を含む氷温の水性懸濁溶液、pH 7.4を50 ml加える。そして、氷水中でバッグを5分間ゆっくり振盪して、便の表面を洗浄する。バッファーは、50 mM N-アセチルシステイン、3 mM酪酸ナトリウム、抗生物質、重炭酸ナトリウム(1 g/リットル)、およびBSA(10 g/l)を含んでいる。N-アセチルシステインは、新鮮なものを調製しなければならない。便の量が少量でも使用することができ、その場合には、便の量に比例してバッファーの量を減らせば良い。

【0143】

細胞懸濁物を含む洗浄溶液をバッグから取り出し、洗浄溶液1 ml当たり0.4グラムのホウ酸を加えてpHを調整する。

【0144】

この洗浄液を4℃で10分間、250gで遠心分離し、上清を注意深く捨てる。沈殿物を10分の1容量の氷冷した懸濁用溶液に懸濁する(上記と同じ)。

【0145】

細胞懸濁液1 ml当たり5~1000万のダイナビーズBerEP4(4.5 μ M)を加える。ビーズはPBSに懸濁してもよい。

【0146】

回転体上で試料を4℃でインキュベートし、磁気ビーズへ細胞の抗体-抗原固定を行わせる。

【0147】

固定された細胞を、磁石(Dyna1 MPC)によってチューブ壁に集め、上清を取り出して捨てる。

【0148】

細胞-ビーズ複合体を2分間ゆっくり攪拌してPBSで洗浄し、磁石によって回収し、洗浄溶液を捨てる。

【0149】

洗浄溶液の茶色が見られなくなるまで、洗浄工程を数回繰り返す。

【0150】

固定した細胞を、十分量のビーズ存在下で、CHAPS溶解用バッファー(実施例1)中で溶解する。通常、DNA DIRECT磁気ビーズを加えると、量が倍になる。

【0151】

テロメラーゼ複合体を持つビーズを、磁石によってチューブ壁に集める。単離された材料はテロメラーゼアッセイに使用することができる。

実施例13:テロメラーゼの単離法とテロメラーゼアッセイ法を組合わせた、尿および痰／頬スワブから上皮細胞を単離する方法

尿中の剥脱細胞を解析すると、膀胱癌患者の62%においてテロメラーゼ活性が検出されたが、悪性でない尿試料83個のうち3個の試料でも弱いシグナルが見られた(Yoshidaら、1997b)。遠心分離によって、50 mlの尿から剥脱細胞を集めた。本実施例で説明する方法では、尿、痰、または他の体液からの剥脱細胞を集める為、上皮細胞に対する抗体で被覆した免疫磁気ビーズを使用する。この方法の利点は、バクテリアや残滓の様な干渉物質を除去できる点である。磁気ビーズによって細胞溶解物からテロメラーゼ複合体を単離し、溶解物の残りを除去した後、解析する。

【0152】

尿細胞試料の調製:

尿、好ましくは、その日初めての尿を採取し、氷上で冷却する。

【0153】

3000万個のダイナビーズBerEP4(または、その他の抗上皮抗体)を尿に加える。試料を5~20分間回転させ、細胞を固定化する。

【0154】

捕捉した細胞を有する磁気ビーズを、強力な磁石(Dyna1 MPC)で集めてから、尿を注意深く捨てる。

【0155】

細胞-ビーズ複合体を冷PBSで2回洗浄し、テロメラーゼを単離する。

【0156】

痰細胞試料の調製:

唾液または痰を瓶に集めて、実施例5の懸濁液のような粘液溶解因子を含む氷冷等張液で希釈する。試料を採取する数時間前は食事をさせないこと。呼吸器系を調べる為に、粘液-毛様体を一掃するかせき込む前に口腔を水で洗浄する。

【0157】

唾液または痰が十分に希釈されて粘性が低下したことを確認した後、BerEP4で被覆した免疫磁気ビーズ(好ましくは $4.5\mu\text{M}$)を加える(3000万個)。試料を5~20分間回転させて細胞を固定化する。

【0158】

捕捉した細胞を有する磁気ビーズを、強力な磁石(Dyna1 MPC)で集め、唾液/痰を注意深く捨てる。

【0159】

細胞-ビーズ複合体を冷PBSで2回洗浄し、テロメラーゼを単離する。

【0160】

テロメラーゼの単離:

この様にして固定した細胞を、十分な量のビーズ存在下、CHAPS溶解用バッファー(実施例1)中で溶解する。DNA DIRECT磁気ビーズを加えると、通常、量が倍になる。

【0161】

テロメラーゼ複合体を有するビーズを、磁石でチューブ壁に集める。この様にして単離された材料は、テロメラーゼアッセイに使用することができる。

【0162】

引用文献

Asai, A.; Kiyozuka, Y.; Yoshida, R.; Fujii, T.; Hioki, K.; Tsubura, A. (1998)

Telomere length, telomerase activity and telomerase RNA expression in human esophageal cancer cells: Correlation with cell proliferation, differentiation and chemosensitivity to anticancer drugs. Anticancer Res. 18: 1465-1472.

Avilion, A.A.; Piatyszek, M.A.; Gupta, J.; Shay, J.W.; Bacchetti, S.; Greider, C.W. (1996) Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res.* 56: 645-650.

Bacchetti, S. and Counter, C.M. (1995). Telomeres and telomerase in human cancer. *Int. J. Oncol.* 7: 423-432.

Bestilny, L.J.; Brown, C.B.; Miura, Y.; Robertson, L.D.; Riabowol, K.T. (1996)

Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines. *Cancer Res.* 56: 3796-3802.

Bisoffi, M.; Chakerian, A.E.; Fore, M.L.; Bryant, J.E.; Hernandez, J.P.; Moyzis, R.K.; Griffith, J.K. (1998)

Inhibition of human telomerase by a retrovirus expressing telomeric antisense RNA. *Eur. J. Cancer* 34: 1242-1249.

Blasco, M.A.; Funk, W.; Villeponteau, B.; Greider, C.W. (1995) Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 269: 1267-1270

Blasco, M.A.; Rizen, M.; Greider, C.W.; Hanahan, D. (1996) Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis. *Nature Genet.* 12: 200-204.

Blasco, M.A.; Lee, H.-W.; Hande, M.P.; Samper, E.; Landsdorp, P.M.; DePinho, R.A.; Greider, C.W. (1997)

Telomere shortening and tumour formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91: 25-34.

Bodnar, A.G.; Ouellette, M.; Frolkis, M.; Holt, S.E.; Chiu, C.-P.; Morin, G.B.; Harley, C.B.; Shay, J.W.; Lichtsteiner, S.; Wright, W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells.

Science 279: 349-352.

Borgnes, A.; Neurater, A.; Kullmann, A.; Deggerdal, A.; Lycke, K.; Larse

n, F. (1996) Detection of isolated colon carcinoma cells in peripheral blood- or bone marrow mononuclear cell suspensions.

Poster (Micrometastasis II), Munchen, June 1996.

Bosnes, M.; Deggerdal, A.; Rian, A.; Korsnes, L.; Larsen, F. (1997) Magnetic separation in molecular biology. Scientific and clinical applications of magnetic carriers. Hafeli et al (ed). Plenum Press, New York.

Brien, T.P.; Kallakury, B.V.S.; Lowry, C.V.; Ambros, R.A.; Muraca, P.J.; Malfetano, J.H.; Ross, J.S. (1997)

Telomerase activity in benign endometrium and endometrial carcinoma. Cancer Res. 57: 2760-2764.

Broccoli, D.; Young, J.W.; de Lange, T. (1995) Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9082-9086.

Bryan, T.M.; Marusic, L.; Bacchetti, S.; Namba, M.; Reddel, R.R. (1997) The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. Hum. Mol. Gen. 6: 921-926.

Burger, A.M.; Double, J.A.; Newell, D.R. (1997) Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. Eur. J. Cancer 33: 638-644.

Califano, J.; Ahrendt, S.A.; Meiningen, G.; Westra, W.H.; Koch, W.M.; Sidransky, D. (1996) Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. Cancer Res. 56: 5720-5722.

Chadaneau, C.; Hay, K.; Hirte, H.W.; Gallinger, S.; Bacchetti, S. (1995) Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. Cancer Res. 55: 2533-2536.

Chiu, C.-P.; Dragowska, W.; Kim, N.W.; Vaziri, H.; Yui, J.; Thomas, T.E.; Harley, C.B.; Lansdorp, P.M. (1996)

Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow.

Stem Cells 14: 239-248.

Chong, L.; van Steensel, B.; Broccoli, D.; Erdjument-Bromage, H.; Hanish, J.; Tempst, P.; de Lange, T. (1995)

A human telomeric protein. Science 270: 1663-1667.

Collins, K. and Greider, C.W. (1993) Tetrahymena telomerase catalyzes nucleocyctic cleavage and nonprocessive elongation.

Genes Dev. 7: 1364-1376.

Collins, K.; Kobayashi, R.; Greider, C.W. (1995) Purification of Tetrahymena telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. Cell 81: 677-686.

Counter, C.M.; Avilion, A.A.; LeFeuvre, C.E.; Stewart, N.G.; Greider, C.W.; Harley, C.B.; Bacchetti, S. (1992)

Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity.

EMBO J. 11: 1921-1929.

Counter, C.M.; Gupta, J.; Harley, C.B.; Leber, B.; Bacchetti, S. (1995) Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. Blood 85: 2315-2320.

Cunningham, V.J.; Markham, N.; Shroyer, A.L. (1998) Detection of telomerase expression in fine-needle aspirations and fluids. Diagn. Cytopathol. 18: 431-436.

Duggan, B.D.; Wan, M.; Yu, M.C.; Roman, L.D.; Muderspach, L.I.; Delgadillo, E.; Li, W.-Z.; Martin, S.E.; Dubeau, L. (1998) Detection of ovarian cancer cells: Comparison of a telomerase assay and cytologic examination. J. Natl. Cancer Inst. 90: 238-242.

Eaton, M.C.; Hardingham, J.E.; Kotasek, D.; Dobrovic, A. (1997) Immunobead RT-PCR: A sensitive method for detection of circulating tumour cells.

- BioTechniques 22: 100-105.
- Edington, K.G.; Loughran, O.P.; Berry, I.J.; Parkinson, E.K. (1995) Cellular immortality: a late event in the progression of human squamous cell carcinoma of the head and neck associated with p53 alteration and a high frequency of allele loss. *Mol. Carcinog.* 13: 254-265.
- Engelhardt, M.; Kumar, R.; Albanell, J.; Pettengell, R.; Han, E.; Moore, M.A.S. (1997) Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood* 90: 182-193.
- Feng, J.; Funk, W.D.; Wang, S.-S.; Weinrich, S.L.; Avilion, A.A.; Chiu, C.-P.; Adams, R.R.; Chang, E.; Allsopp, R.C.; Yu, J.; Le, S.; West, M.D.; Harley, C.B.; Andrews, W.H.; Greider, C.W.; Villeponteau, B. (1995) The RNA component of human telomerase. *Science* 269: 1236-1241.
- Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43: 405-413.
- Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1987) The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51: 887-898.
- Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1989) A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337: 331-337.
- Greider, C.W. (1996) Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 337-365.
- Hardingham, J.E.; Kotasek, D.; Farmer, R.N.; Butler, J.-X.; Sage, R.E.; Dobrovic, A. (1993) Immunobead-PCR: a technique for the detection of circulating tumor cells using immunomagnetic beads and the polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 53: 3455-3458.

Hardingham, J.E.; Kotasek, D.; Sage, R.E.; Eaton, M.C.; Pascoe, V.H., Dobrovic, A. (1995) Detection of circulating tumour cells in colorectal cancer by immunobead-PCR is a sensitive prognostic marker for relapse of disease.

Mol. Med. 1: 789-794.

Harle-Bachor, C. and Boukamp, P. (1996) Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6476-6481.

Harley, C.B.; Futcher, A.B.; Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.

Nature 345: 458-460.

Harley, C.B. (1991) Telomere loss: mitotic clock or genetic bomb? Mutat. Res. 256: 271-282.

Harley, C.B. (1995) Telomeres and aging. Telomeres, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 247-263.

Harley, C.B. and Villeponteau, B. (1995) Telomeres and telomerase in aging and cancer.

Curr. Opin. Genetics Dev. 5: 249-255.

Harrington, L. and Greider, C.W. (1991) Telomerase primer specificity and chromosome healing.

Nature 353: 451-454.

Harrington, L.; McPhail, T.; Mar, V.; Zhou, W.; Oulton, R.; Program, A.E.S.T.; Bass, M.B.; Arruda, I.; Robinson, M.O. (1997) A mammalian telomerase-associated protein. Science 275: 973-977.

Hayflick, L. (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 37: 614-636.

Heine, B.; Hummel, M.; Muller, M.; Heicappell, R.; Miller, K.; Stein, H.

(1998) Non-radioactive measurement of telomerase activity in human bladder cancer, bladder washings, and in urine. *J. Pathol.* 184: 71-76.

Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9: 28-33.

Hiyama, E.; Hiyama, K.; Yokoyama, T.; Matsuura, Y.; Piatyszek, M.A.; Shay, J.W. (1995a)

Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nature Med.* 1: 249-255.

Hiyama, E.; Yokoyama, T.; Tasumoto, N.; Hiyama, K.; Imamura, Y.; Murakami, Y.; Kodama, T.; Piatyszek, M.A.; Shay, J.W.; Matsuura, Y.; (1995b) Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res.* 55: 3258-3262.

Hiyama, E.; Hiyama, K.; Tatsumoto, N.; Kodama, T.; Shay, J.W.; Yokoyama, T. (1996a)

Telomerase activity in human intestine. *Int. J. Oncol.* 9: 453-458.

Hiyama, E.; Gollahon, L.; Kataoka, T.; Kuroi, K.; Yokoyama, T.; Gazdar, A.F.; Hiyama, K.; Piatyszek, M.A.; Shay, J.W. (1996b) Telomerase activity in human breast tumours. *JNCI* 88: 116-122.

Hiyama, K.; Hirai, Y.; Kyoizumi, S.; Akiyama, M.; Hiyama, E.; Piatyszek, M.A.; Shay, J.W.; Ishioka, S., Yamakido, M. (1995) Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 155: 3711-3715.

Hohaus, S.; Voso, M.T.; Barbera, E.O.-L.; Cavallo, S.; Bellacosa, A.; Ruttella, S.; Rumi, C.; Genuardi, M.; Neri, G.; Leone, G. (1997) Telomerase activity in human hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* 82: 262-268.

Holt, S.E.; Shay, J.W.; Wright, W.E. (1996a) Refining the telomere-telomerase hypothesis of aging and cancer.

Nature Biotechnol. 14: 836-839.

Holt, S.E.; Wright, W.E.; Shay, J.W. (1996b) Regulation of telomerase activity in immortal cell lines.

Mol. Cell Biol. 16: 2932-2939.

Hsiao, R.; Sharma, H.S.; Ramakrishnan, S.; Keith, E.; Narayanan, R. (1997)

Telomerase activity in normal human endothelial cells. Anticancer Res. 17: 827-832.

Kanaya, T.; Kyo, S.; Takakura, M.; Ito, H.; Namiki, M.; Inoue, M. (1998) hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma. Int. J. Cancer 78: 539-543.

Kannan, S.; Tahara, H.; Yokozaki, H.; Mathew, B.; Nalinakumari, K.R.; Nair, M.K.; Tahara, E. (1997)

Telomerase activity in premalignant and malignant lesions of human oral mucosa.

Cancer Epidemiolgy, Biomarkers & Prevention 6: 413-420.

Kavaler, E.; Landman, J.; Chang, Y.; Droller, M.J.; Liu, B.C.-S. (1998) Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity. Cancer 82:708-714.

Kilian, A.; Bowtell, D.D.L.; Abud, H.E.; Hime, G.R.; Venter, D.J.; Keese, P.K.; Duncan, E.L.; Reddel, R.R.; Jefferson, R.A. (1997) Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. Hum. Mol. Gen. 6: 2011-2019.

Kim, N.W.; Piatyszek, M.A.; Prowse, K.R.; Harley, C.B.; West, M.D.; Ho, P.L.C.; Coviello, G.M.; Wright, W.E.; Weinrich, S.L.; Shay, J.W. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer.

Science 266: 2011-2015.

- Kim, N.W., and Wu, F. (1997). Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucl. Acids Res.* 25: 2595-2597.
- Kim, N.W. (1997) Clinical implications of telomerase in cancer. *Eur. J. Cancer* 33(5): 781-786.
- Kolquist, K.A.; Elliesen, L.W.; Counter, C.M.; Meyerson, M.; Tan, L.K.; Weinberg, R.A.; Haber, D.A.; Gerald, W.L. (1998) Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nature Genet.* 19: 182-186.
- Kvalheim, Gunnar – Clinical Stem Cell Laboratory, Norwegian Radium Hospital. Personal communication
- Kyo, S.; Takakura, M.; Kohama, T.; Inoue, M. (1997) Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res.* 57: 610-614.
- Le, S.; Zhu, J.J.; Anthony, D.C.; Greider, C.W.; Black, P.M. (1998) Telomerase activity in human gliomas. *Neurosurgery* 42: 1120-1125.
- Leber, B. and Bacchetti, S. (1996) Telomeres and telomerase in normal and malignant haematologic cells. *Leuk. Lymphoma* 24: 1-9.
- Lee, M.S. and Blackburn, E.H. (1993) Sequence-specific DNA primer effects on telomerase polymerization activity. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6586-6599.
- Lycke, K.; Kullmann, A.; Bosnes, M.; Larsen, F. (1997) Immunomagnetic enrichment of carcinoma cells from blood and bone marrow combined with RT-PCR for improved detection of micrometastasis. Poster (PCR in Oncology), Heidelberg, April 1997.
- McClintock, B. (1941) The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26: 234-282.

Meyerson, M.; Counter, C.M.; Eaton, E.N.; Elliesen, L.W.; Steiner, P.; Caddle, S.D.; Ziaugra, L.; Beijersbergen, R.L.; Davidoff, M.J.; Liu, Q.; Bacchetti, S.; Haber, D.A.; Weinberg, R.A. (1997) hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90: 785-795.

Morin, G.B. (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59: 521-529.

Morin, G.B. (1991) Recognition of a chromosome truncation site associated with alpha-thalassaemia by human telomerase.

Nature 353: 454-456.

Moyzis, R.K.; Buckingham, J.M.; Cram, L.S.; Dani, M.; Deaven, L.L.; Jones, M.D.; Meyne, J.; Ratliff, R.L.; Wu, J.-R. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6622-6626.

Muller, H.J. (1938) The remarking of chromosomes. *The Collecting Net-Woods Hole* 13: 181-198.

Muller, M.; Heine, B.; Heicappell, R.; Emrich, T.; Hummel, M.; Stein, H.; Miller, K. (1996)

Telomerase activity in bladder cancer, bladder washings and in urine. *Int. J. Oncol.* 9: 1169-1173.

Muller, M.; Krause, H.; Heicappell, R.; Tischendorf, J.; Shay, J.W.; Miller, K. (1998)

Comparison of human telomerase RNA and telomerase activity in urine for diagnosis of bladder cancer.

Clinical Cancer Research 4: 1949-1954.

Murakami, J.; Nagai, N.; Ohama, K.; Tahara, H.; Ide, T. (1997) Telomerase activity in ovarian tumors.

Cancer 80: 1085-1092.

Murakami, J.; Nagai, N.; Ohama, K. (1998) Telomerase activity in body cavity fluid and peritoneal washings in uterine and ovarian cancer. *J. Int. Med. Res.* 26: 129-139.

Nakamura, T.M.; Morin, G.B.; Chapman, K.B.; Weinrich, S.L.; Andrews, W.H.; Ligner, J.; Harley, C.B.; Cech, T.R. (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277: 955-959.

Nakayama, J-i.; Saito, M.; Nakamura, H.; Matsuura, A.; Ishikawa, F. (1997) TLP1: A gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* 88: 875-884.

Naume, B.; Borgen, E.; Beiske, K.; Herstad, T.-K.; Ravnas, G.; Renolen, A.; Trachsel, S.; Thrane-Steen, K.; Funderud, S.; Kvalheim, G. (1997) Detection of isolated breast carcinoma cells in peripheral blood or bone marrow by immunomagnetic techniques. *J. Hematotherapy* 6: 103-114.

Neurater, A.; Edward, R.; Kilaas, L.; Ugelstad, J.; Larsen, F. (1998) Immunomagnetic separation of animal cells.

In *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2nd edition. Celis, J.E. (editor), Academic Press: 197-204.

Norrbäck, K-F.; Dahlenborg, K.; Carlsson, R.; Roos, G. (1996) Telomerase activation in normal B lymphocytes and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 88: 222-229.

Olovnikov, A.M. (1973) A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* 41: 181-190.

Pelkey, T.J.; Frierson Jr., H.F.; Bruns, D.E. (1996) Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastasis from solid tumors. *Clin. Chem.* 42: 1369-1381.

Piatyszek, M.A., Kim, N.W., Weinrich, S.L., Hiyama, K., Hiyama, E., Wright, W.E. and Shay, J.W. (1995). Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol. *Meth. C*

ell. Sci. 17: 1-15.

Pluta, A.F.; Dani, G.M.; Spear, B.B.; Zakian, V.A. (1984) Elaboration of telomeres in yeast: Recognition and modification of termini from *Oxytricha* macronuclear DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1475-1479.

Ramirez, R.D.; Wright, W.E.; Shay, J.W.; Taylor, R.S. (1997) Telomerase activity concentrates in active segments of human hair follicles. J. Invest. Dermatol. 108: 113-117.

Savoysky, E., Akamatsu, K., Tsuchiya, M. and Yamazaki, T. (1996). Detection of telomerase activity by combination of TRAP method and scintillation proximity assay. Nucl. Acid Res. 24: 1175-1176.

Sharma, H.W.; Sokoloski, J.A.; Perez, J.R.; Maltese, J.Y.; Sartorelli, A.C.; Stein, C.A.; Nichols, G.; Khaled, Z.; Telang, N.T.; Narayanan, R. (1995) Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 12343-12346.

Shay, J.W. and Wright, W.E. (1996) Telomerase activity in human cancer. Curr. Op. Oncol. 8: 66-71.

Shay, J.W. and Bacchetti, S. (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. Eur. J. Cancer 33: 787-791.

Sommerfeld, H.J.; Meeker, A.K.; Piatyszek, M.A.; Bova, G.S.; Shay, J.W.; Coffey, D.S. (1996)

Telomerase activity: A prevalent marker of malignant human prostate tissue. Cancer Res. 56: 218-222.

Suehara, N.; Mizumoto, K.; Kusumoto, M.; Niiyama, H.; Ogawa, T.; Yamaguchi, K.; Yokohata, K.; Tanaka, M. (1998) Telomerase activity detected in pancreatic juice 19 months before a tumor is detected in a patient with pancreatic cancer. Am. J. Gastroenterol. 93: 1967-1971.

Sugino, T.; Yoshida, K.; Bolodeku, J.; Tahara, H.; Buley, I.; Manek, S.; Wells, C.; Goodison, S.; Ide, T.; Suzuki, T.; Tahara, E.; Tarin, D. (1996) Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesion

s: Diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle aspirates. *Int. J. Cancer* 69: 301-306.

Sugino, T.; Yoshida, K.; Bolodeku, J.; Tarin, D.; Goodison, S. (1997) Telomerase activity and its inhibition in benign and malignant breast lesions. *J. Pathol.* 183: 57-61.

Sumida, T.; Sogawa, K.; Hamakawa, H.; Sugita, A.; Tanioka, H.; Ueda, N. (1998)

Detection of telomerase activity in oral lesions. *J. Oral Pathol. Med.* 27: 111-115.

Sun, D.; Hurley, L.H.; Von Hoff, D.D. (1998) Telomerase assay using biotinylated-primer extension and magnetic separation of the products. *BioTechniques* 25: 1046-1051.

Szostak, J.W. and Blackburn, E.H. (1982) Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29: 245-255.

Tahara, E.; Semba, S.; Tahara, H. (1996) Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin. Oncol.* 23: 307-315.

Taylor, R.S.; Ramirez, R.D.; Ogoshi, M.; Chaffins, M.; Piatyszek, M.A.; Shay, J.W. (1996)

Detection of telomerase activity in malignant and non-malignant skin conditions. *J. Invest. Dermatol.* 106: 759-765.

TRAPeze Telomerase Detection Kit Catalog #7700 Kit, 2nd edition, Oncor Inc.

Ulaner, G.A.; Hu, J.-F.; Vu, T.H.; Giudice, L.C.; Hoffman, A.R. (1998) Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternative splicing of hTERT transcripts.

Cancer Res. 58: 4168-4172.

van Steensel, B. and de Lange, T. (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1.

Nature 385: 740-743.

Vaziri, H.; Dragowska, W.; Allsopp, R.C.; Thomas, T.E.; Harley, C.B.; Lansdorp, P.M. (1994) Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9857-9860.

Vaziri, H. and Benchimol, S. (1998) Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. Curr. Biology 8: 279-282.

Watson, J.D. (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. Nat. New Biol. 239: 197-201.

Weinrich, S.L.; Pruzan, R.; Ma, L.; Ouellette, M.; Tesmer, V.M.; Holt, S.E.; Bodnar, A.G.; Lichtsteiner, S.; Kim, N.W.; Trager, J.B.; Taylor, R.D.; Carlos, R.; Andrews, W.H.; Wright, W.E.; Shay, J.W.; Harley, C.B.; Morin, G.B. (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. Nature Genet. 17: 498-502.

Weng, N.-p.; Levine, B.L.; June, C.H.; Hodes, R.J. (1996) Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. J. Exp. Med. 183: 2471-2479.

Weng, N.-p.; Levine, B.L.; June, C.H.; Hodes, R.J. (1997a) Regulation of telomerase RNA template expression in human T lymphocyte development and activation. J. Immunol. 158: 3215-3220.

Weng, N.-p.; Granger, L.; Hodes, R.J. (1997b) Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10827-10832.

Wright, W.E., Shay, J.W. and Piatyszek, M.A. (1995). Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. Nucleic Acid Res. 18: 3794-3795.

Wright, W.E.; Piatyszek, M.A.; Rainey, W.E.; Byrd, W.; Shay, J.W. (1996)

- Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* 18: 173-179.
- Xu, D.; Gruber, A.; Peterson, C.; Pisa, P. (1996) Suppression of telomerase activity in HL60 cells after treatment with differentiating agents. *Leukemia* 10: 1354-1357.
- Yang, C.-T.; Lee, M.-H.; Lan, R.-S.; Chen, J.-K. (1998) Telomerase activity in pleural effusions: Diagnostic significance. *J. Clin. Oncol.* 16: 567-573.
- Yasumoto, S.; Kunimura, C.; Kikuchi, K.; Tahara, H.; Ohji, H.; Yamamoto, H.; Ide, T.; Utakoji, T. (1996) Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* 13: 433-439.
- Yoshida, K.; Sugino, T.; Goodison, S.; Warren, B.F.; Nolan, D.; Wadsworth, S.; Mortensen, N.J.; Toge, T.; Tahara, E.; Tarin, D. (1997a) Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells in colonic luminal washings and its related clinical implications. *Br. J. Cancer* 75: 548-553.
- Yoshida, K.; Sugino, T.; Tahara, H.; Woodman, A.; Bolodeoku, J.; Nargund, V.; Fellows, G.; Goodison, S.; Tahara, E.; Tarin, D. (1997b) Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer* 79: 362-369.
- Yoshida, K.; Sakamoto, S.; Sumi, S.; Higashi, Y.; Kitahara, S. (1998) Telomerase activity in renal cell carcinoma. *Cancer* 83: 760-766.
- Yu, G.L.; Bradley, J.D.; Attardi, L.D.; Blackburn, E.H. (1990) In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature* 344: 126-132.
- Zakian, V.A. (1997) Life and cancer without telomerase. *Cell* 91: 1-3.

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Larsen, Frank
      Skaanseng, Marianne

<120> Detecting Enzyme Activity

<130> Telomerase isolation

<140>
<141>

<150> GB/9902302.0
<151> 1999-02-02

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 490
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
ggguugcgga gggugggccu gggaggggug guggccauuu uuugucuaac ccuaacugag 60
aaggggcguag gcgccgugcu uuugcucccc gcgcgcuguu uuucucgcug acuuucagcg 120
ggcggaagaaag ccucggccug ccgccuucca ccguucauuc uagagcaaac aaaaaauguc 180
agcugcuggc ccguucgcu cccggggacc ugcggcgguu cgccugccca gccccgaaac 240
cccgcugga gccgcgugc gcccggggcu ucuccggagg caccacugc caccgcgaag 300
aguuggguc ugcagccgc gggucucucg ggggcgaggg cgagguuac cguuucaggc 360
cgagggaaga ggaacggagc gagucccgcc gcggcgcgau ucccugagcu gugggacgug 420
caccaggaac ucggcucaca caugcaguuc gcuuuccugu uggugggggg aacgccgauc 480
gugcgcaucc                                     490

```

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、様々な細胞型における、複製年齢に対するテロメア長をグラフ化したものである。

【図 2】 図 2 は、ヒトテロメラーゼの予想メカニズムを表したものである。

【図 3】 図 3 は、テロメラーゼ反復アッセイ法に関する検出限界を具体的に示した実施例 1 に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図 4】 図 4 は、磁気ビーズによるテロメラーゼ活性の単離を具体的に示した実施例 2 に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図 5】 図 5 は、ダイナビーズ (Dynabeads) DNA DIRECT を用いたテロメラーゼ活性の単離を具体的に示した実施例 3 に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図 6】 図 6 は、エポキシドビーズ量を増加させてテロメラーゼ活性を単離する方法を具体的に示した実施例 4 に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図7】 図7は、ビーズ法によるテロメラーゼ単離を行った後、残りの溶解画分におけるゲノムDNAの存在についてのテストを具体的に示した実施例5に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図8】 図8は、ポリマー磁気ビーズへのタンパク質の結合を具体的に示した実施例6に記載のSDS-PAGEゲルを示す。

【図9】 図9は、テロメラーゼ単離法の感度と信頼度を具体的に示した実施例7に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図10】 図10は、血液中循環性癌細胞の濃縮と、その後のテロメラーゼ活性の検出を具体的に示した実施例8に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図11】 図11は、乳癌患者胸膜の微小転移巣細胞におけるテロメラーゼ活性を具体的に示した実施例9に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図12】 図12は、TRAPアッセイ法によるテロメラーゼの単離と、微小転移巣細胞検出用細胞溶解物からのmRNAの単離との組合せを具体的に示すフローチャートである。

【図13】 図13は、大便から単離された結腸細胞中のテロメラーゼ活性を検出する方法を具体的に示すフローチャートである。

図面参照用

図3

レーン1:対照、細胞なし、レーン2:細胞40個、レーン3:細胞50個、レーン4:細胞75個、レーン5:細胞100個、レーン6:細胞500個、レーン7:陽性対照、レーン8:陰性PCR対照

図4

レーンL:分子量ラダー (ladder) マーカー (10 bp)

レーン1:溶解物画分-100万個のダイナビーズ (Dynabeads) を使用 (15 μ g)

レーン2:ビーズ画分-100万個のダイナビーズを使用

レーン3:溶解物画分-1000万個のダイナビーズを使用 (150g)

レーン4:ビーズ画分-1000万個のダイナビーズを使用

レーン5:溶解物画分-2000万個のダイナビーズを使用 (300g)

レーン6:ビーズ画分-2000万個のダイナビーズを使用
 レーン7:1000個のSW480細胞の溶解物-分画なしで試験
 レーン8:キットのTSR8陽性対照2(1

図 5

レーン1:溶解物画分-1000万個のダイナビーズを使用(150(g)
 レーン2:ビーズ画分-1000万個のダイナビーズを使用
 レーン3:溶解物画分-2000万個のダイナビーズを使用(300(g)
 レーン4:ビーズ画分-2000万個のダイナビーズを使用
 レーン5:溶解物画分-3000万個のダイナビーズを使用(450(g)
 レーン6:ビーズ画分-3000万個のダイナビーズを使用
 レーン7:陰性PCR対照
 レーン8:キットのTSR8陽性対照2(1

図 6

レーン1:50(gのビーズ、レーン2:100(gのビーズ、レーン3:150(gのビーズ、レーン4:200(gのビーズ、レーン5:250(gのビーズ、レーン6:300(gのビーズ、レーン7:350(gのビーズ、レーン8:400(gのビーズ、レーン9:TRAPアッセイ陽性対照、レーン10:陰性PCR対照

図 7

レーン1+2:10,000個の細胞と、ビーズ結合物質の溶出物、レーン3+4:5000個の細胞-ビーズ結合物質の溶出物、レーン5+6:1,000個の細胞-ビーズ結合物質の溶出物、レーン7+8:10,000細胞の溶解物から単離されたDNA、レーン9+10:5,000細胞の溶解物から単離されたDNA、レーン11+12:1,000細胞の溶解物から単離されたDNA、レーン13:陽性対照-10 ngの胎盤DNA、レーン14:陰性PCR対照、L:分子量標準マーカー-100 bpラダー

図 8

レーンH:高分子量標準マーカー;レーンL:低分子量標準マーカー;レーン1と2:ビーズからの溶出物(80000細胞からの抽出物);レーン3と4:ビーズからの溶出物(53000細胞からの抽出物)

図 9

レーン1~5:50細胞、レーン6:陽性対照、レーン7:陰性対照

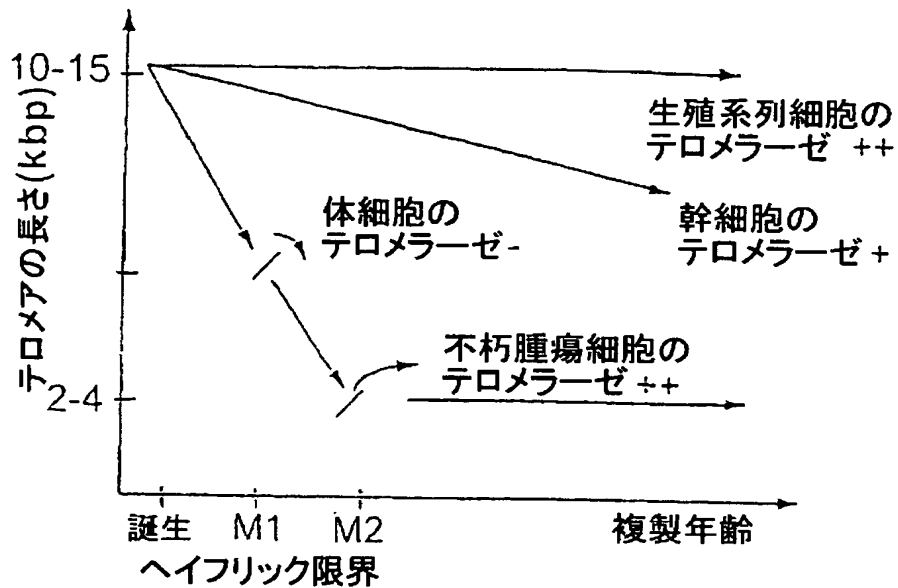
図10

レーン1:0細胞;レーン2:40細胞;レーン3:50細胞;レーン4:75細胞;レーン5:100細胞;レーン6:500細胞;レーン7:陽性対照(500細胞を直接試験)、レーン8:陰性対照

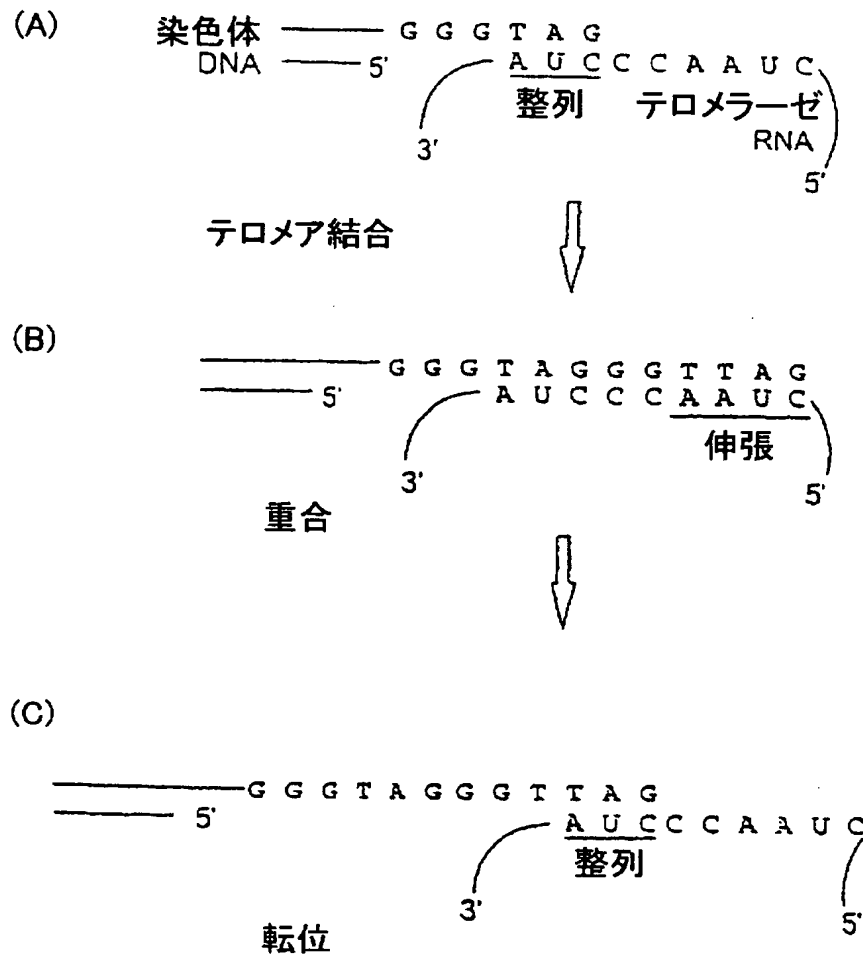
図11

レーン1:胸膜試料(ビーズ単離テロメラーゼ);レーン2:胸膜試料(残りの溶解物);
レーン3:胸膜試料の残り(溶出物);レーン4:胸膜試料の残り(溶解物);レーン5:陽性対照(鋳型TAR8);レーン6:陰性対照

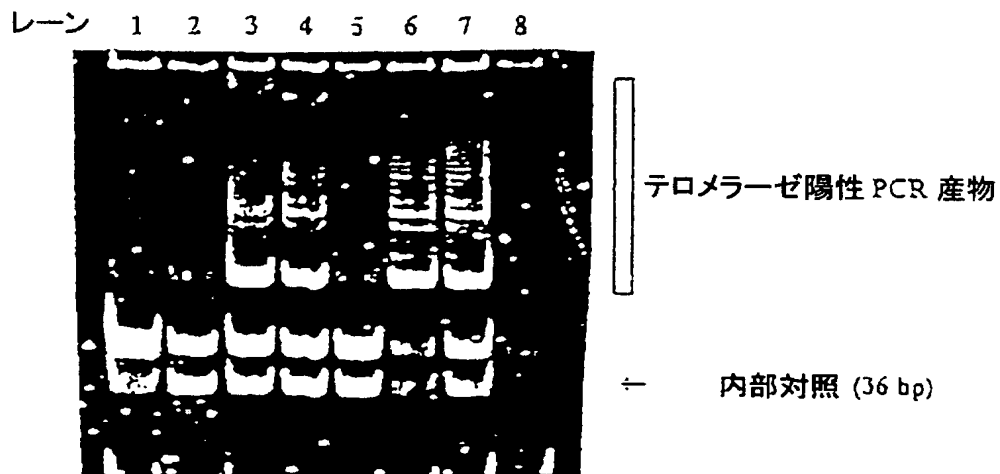
【図1】



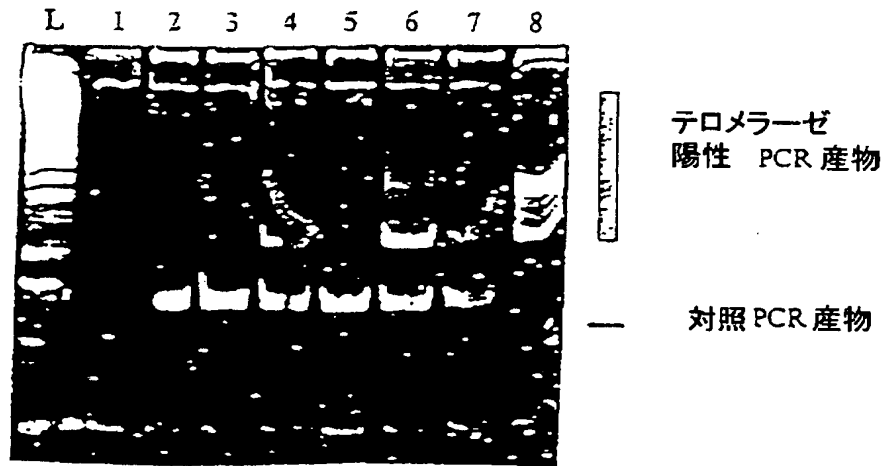
【図2】



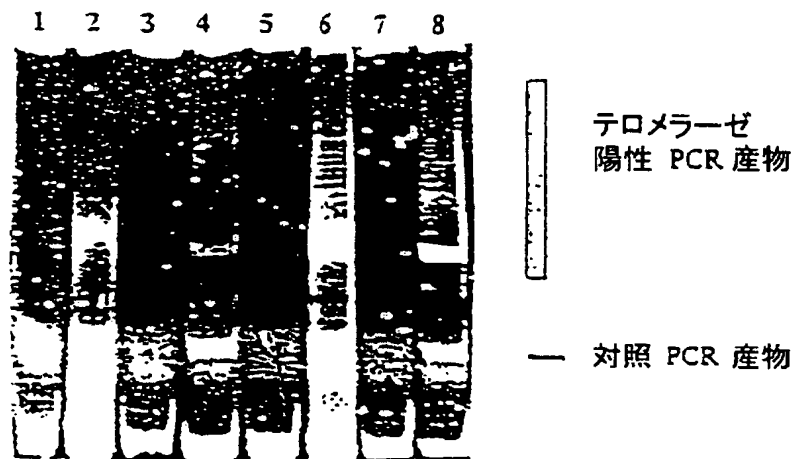
【図3】



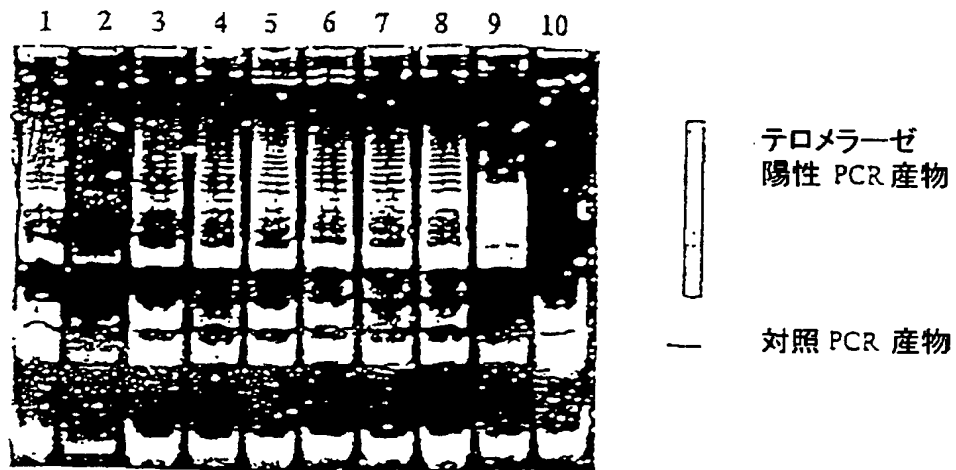
【図4】



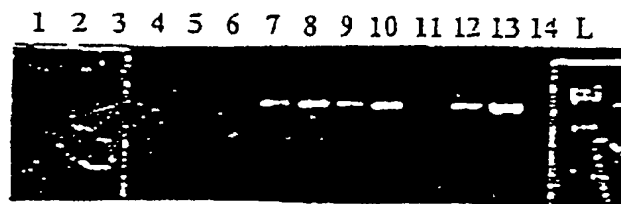
【図5】



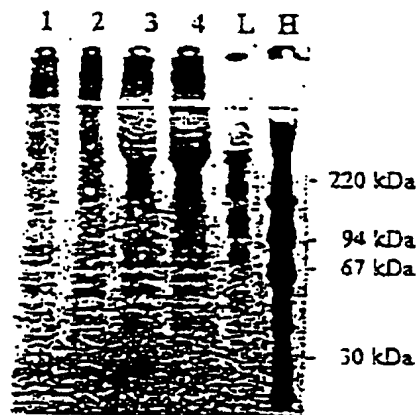
【図6】



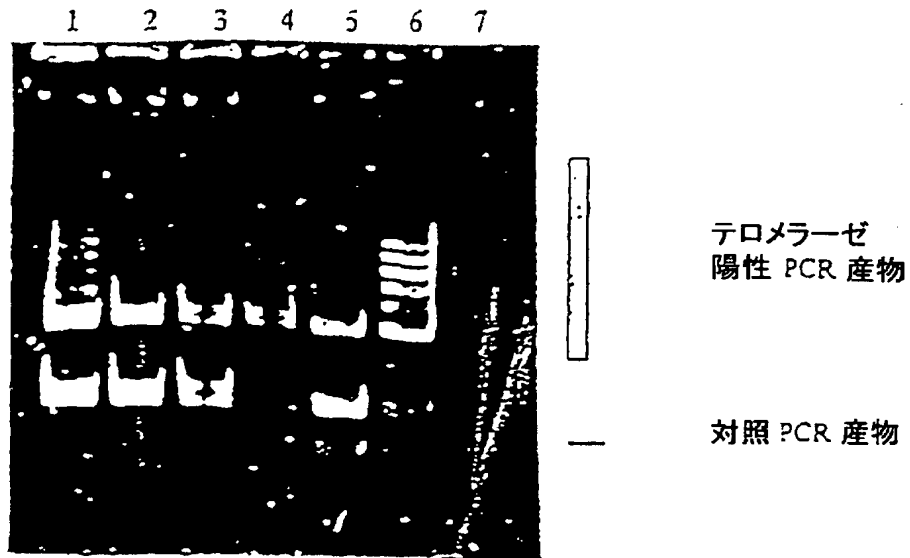
【図7】



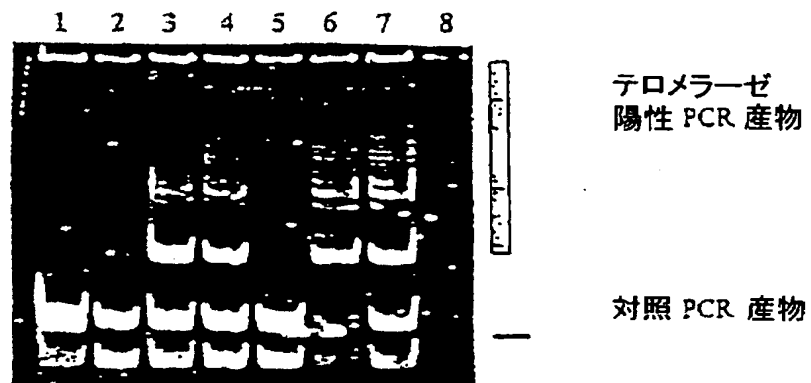
【図8】



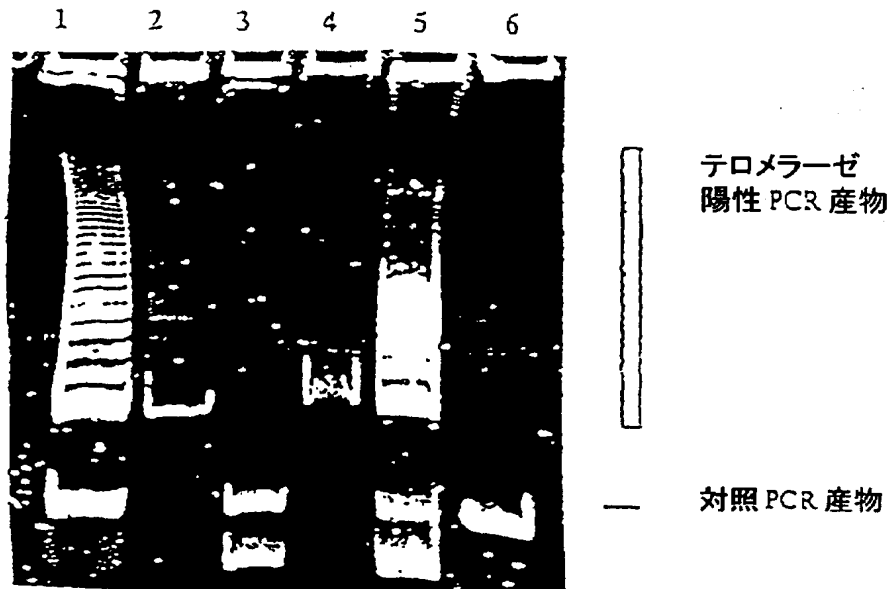
【図9】



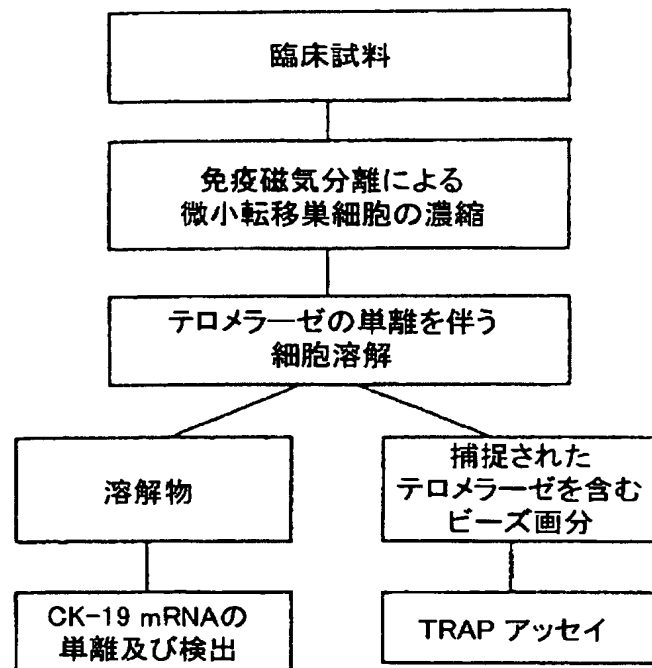
【図10】



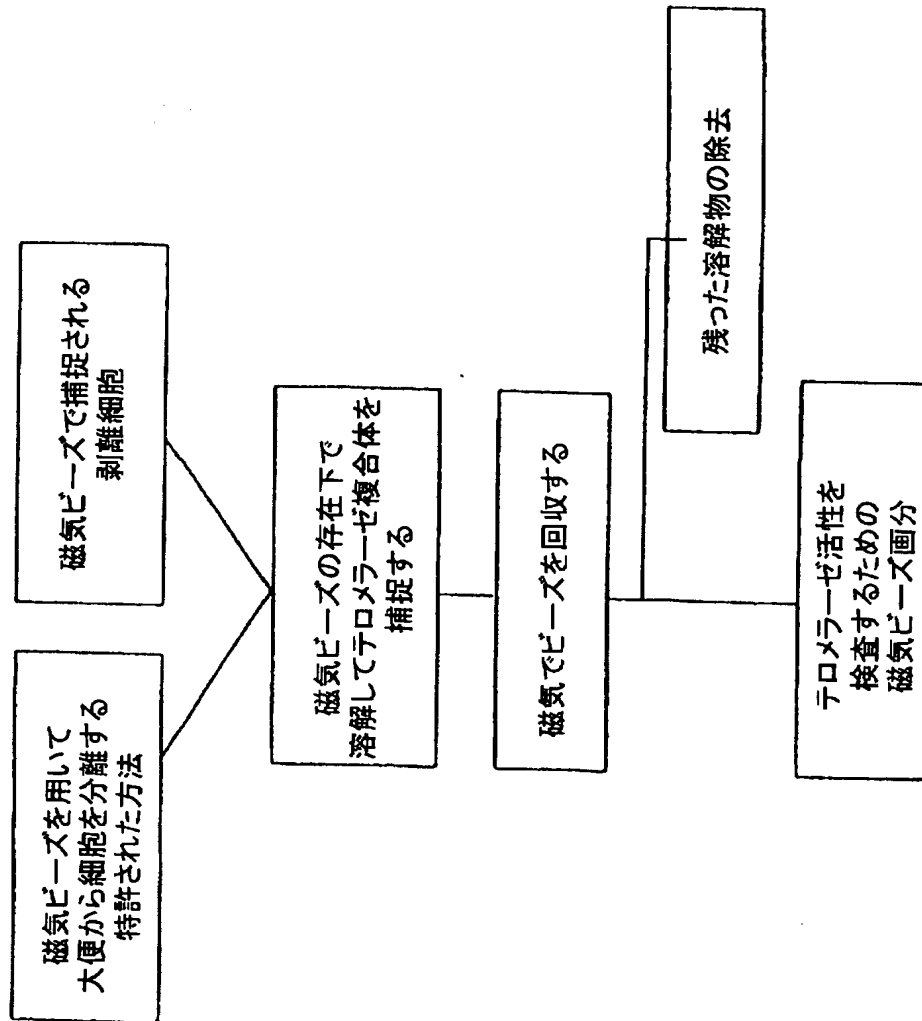
【図11】



【図12】



【図13】



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年2月23日(2001.2.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

癌細胞におけるテロメラーゼの発現

テロメラーゼ活性は、不朽ヒト細胞集団および悪性腫瘍では見られたが、この段階の前では一般的に活性が見られないことから、大部分のヒト腫瘍の進行及び臨床上の死にとっては、細胞の不朽化及びテロメラーゼ再活性化が必須であるが、その形成には必須でないことが示唆されている(Kimら、1994; Edingtonら、1995)。多くの癌症例において、細胞がMI期を克服して、その寿命を延ばすことを可能にするp53やpRb等の腫瘍抑制因子を不活性化(図1)することによって、更なる変異の蓄積が生じ、直接的にゲノムの不安定化が導かれることになる(Harley, 1991, 1995)。多くのヒト腫瘍の場合に見られる様に、テロメアを非常に短いままで維持すれば、染色体末端を安定化させて、細胞分裂させるのには十分であろう。しかしながら、このような安定化では、染色体組換えが増加する可能性を抑えることは全くできず、ゲノムの不安定と腫瘍進行をもたらすかもしれない。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

テロメラーゼ活性を検出する為に用いられる方法は、TRAPアッセイ法と呼ばれている(テロメア反復増幅プロトコル telomeric repeat amplification protocol)(Kimら、1994)。細胞を、テロメラーゼ活性がそのまま維持されるような方法

で溶解する。添加した合成オリゴヌクレオチドを酵素で伸長させた後、検出を行なう為、特異的なテロメア産物をPCRで増幅する。この方法によって、テロメラーゼ研究分野での実験が大いに簡易化された。これまでに、ヒト腫瘍の殆どすべてのタイプで、この酵素の存在がスクリーニングされ、895種類の哺乳動物腫瘍を調べた中で759種類(即ち85%)でテロメラーゼ活性が発現していることが分かった(ShayとBacchetti, 1997)。

WO97/15687は、テロメラーゼ活性を検出する為の二つの反応プロトコルを開示している。第一の反応により、テロメラーゼ基質から当該テロメラーゼ基質の伸長産物が生成され、第二の反応は、当該伸長産物の複製及び/又は結合プローブにより生成されたシグナルの増幅を包含している。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

テロメラーゼ陽性の悪性腫瘍細胞だけでなく、テロメラーゼ陰性の体細胞においてhTRが発現していることは、このRNA成分だけが、酵素活性に必要な唯一の因子でないことを示しているにちがいない。これは、in vitroで腫瘍細胞の分化を実験的に誘導している間にテロメラーゼ活性が減少しても、hTRレベルは影響を受けず(Fengら、1995)、様々な腫瘍におけるhTRレベルからは、腫瘍におけるテロメラーゼ活性レベルを予測できるとは言えない(Avilionら、1996)という知見とも合致する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

これとは対照的に、hTERTはテロメラーゼ活性と相関関係がある(Nakamuraら、1997; Meyersonら、1997; Kilianら、1997; Kolquistら、1998; Kanayaら、1998)。hTERTの発現は、培養細胞を不朽化する過程でテロメラーゼの活性化と同時に上方制御され、in vitroでの細胞分化過程で下方制御される(Meyersonら、1997)。これらの結果は、細胞の不朽化と腫瘍進行の過程では、hTERT mRNA発現の誘導にはテロメラーゼ活性が必要であることを示唆している。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

診断マーカーおよび可能な予後マーカーとしてのテロメラーゼ

テロメア長とテロメラーゼ活性との間の関連が、癌および老化に関与しているとする、腫瘍細胞におけるテロメラーゼ活性を解析・定量することは理に適っている。これは、診断マーカーおよび予後マーカーとなり得、また、それ自体治療標的となり得る。現在あるデータは、テロメラーゼが、今までに知られた中で最も特異的で普遍的な腫瘍マーカーであることを示唆している。更に、多くの研究によって、いくつかの癌においては、テロメラーゼ発現が臨床結果と相関関係があることを示しており(BacchettiとCounter, 1995; ShayとWright, 1996; ShayとBacchetti, 1997; Leら、1998; Yoshidaら、1998)、このことは、テロメラーゼが、この様な癌においては診断マーカーとしてだけでなく予後マーカーとしても用いることができることを意味している。一般的に、テロメラーゼ活性レベルは、癌疾患の重篤度が増すにつれて増加する(Counterら、1995; Hiyama E.ら、1995a, 1996a)が、同じタイプや同じ段階にある腫瘍の間でもかなり変動する。収集されたデータは、テロメラーゼが普遍的且つ特異的な腫瘍マーカーであることを示している(Bacchetti及びCounter, 1995; Leber及びBacchetti, 1996; Shay及びWright, 1996; ShayとBacchetti, 1997)。テロメラーゼ活性の存在によって、正常なテロメラーゼ受容細胞か癌細胞の存在を示し得る。同様に、テロメラー

ゼ活性がないことは、テロメラーゼ無発現 (silent) 正常細胞、または正常なテロメラーゼ受容細胞の休止状態を示しているかもしれない。従って、テロメラーゼ活性レベルの予後的な価値は、対照実験を注意深く行わないかぎり制限されるものである。このことは、ある種の造血細胞が低レベルのテロメラーゼ活性を示す為、血液および骨髄を循環性癌細胞の検出が複雑になるという事実によって具体的に説明される。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0036】

テロメラーゼ酵素複合体の単離方法

TRAPアッセイ法を行なう前、細胞を単離する為の磁気ビーズによる最初の実験で紛らわしい結果が出た。磁気によって分離した細胞を、TRAPezeキット (Oncor Inc. 米国) に含まれていた溶解用バッファーで溶解し、磁気ビーズを除去してから、溶解物を用いてテロメア反復アッセイプロトコルを行なった。その結果、強い陽性を示すことが明らかな株化細胞でさえ、活性がないか、或いは非常に弱い活性しか見られなかった。驚くべきことに、テロメラーゼ活性は、細胞の溶解後は磁気ビーズに追随し、十分なビーズが存在すると、溶解物中のすべての活性が失われてしまう (実施例2、3、4、7)。本発明者らは、これを、簡易且つ迅速に、粗溶解物からテロメラーゼ複合体を単離する方法へと発展させた。TRAPアッセイ法は、溶解物によって阻害され易いことが報告されているが、このことは特に、解析する材料が多すぎるときに当てはまる (Broccoliら、1995; Norrback 1996)。まず、TRAP反応が阻害されない条件を同定する為、各抽出毎に、TRAP反応を行わなければならない。この反応は通常、溶解物中のタンパク質量を測定し、各アッセイにつき、 $0.1\mu\text{g} \sim 1.0\mu\text{g}$ を含む試料を用いて行なわれるが、これは、 $2.5\mu\text{g} \sim 25\mu\text{g}$ で阻害を受けることが報告されているからである (Broccoliら、1995)。内部対照を含有することによって、僅かな阻害でも検出することが

できる(Wrightら、1995)。陰性の試験結果が出た試料のうちいくつかは、実際には、TRAPアッセイの阻害により偽陰性であることが明らかになった(Suginoら、1997)。テロメラーゼ複合体を単離することによって阻害を回避することができ、より多量の試料中テロメラーゼ活性をスクリーニングすることができる。これは例えば、血液、骨髄または組織中の幹細胞や、リンパ節中の癌細胞転移または循環性微小転移巣等、テロメラーゼ陽性細胞が試料中の微量画分を代表しているときに、特に有用である。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

本発明者らは、抗体で被覆した $2.8\mu\text{m}$ (実施例2、8、9)または $4.5\mu\text{m}$ の大きさのビーズ、これらと同じ大きさの被覆されていない磁気ビーズ、およびダイナビーズ(Dynabeads(登録商標))DNA DIRECT(実施例3、4)という、様々な種類の磁気ダイナビーズ(Dynabeads(登録商標))を使っていたが、これまでに調べたビーズタイプはすべて、テロメラーゼ複合体を単離するものであった。テロメラーゼが染色体DNAの末端に作用するという事実からすれば、テロメラーゼは、染色体DNAを介して磁気ビーズに間接的に結合していたという仮説が当然出てくる。DNAを単離する為に開発されたビーズは、テロメラーゼを捕捉する為にも使用できることが示されたとき、この仮説が裏付けられた(実施例3)。この仮説を証明する為には、テロメラーゼを単離した後のビーズ画分にDNAが存在することを示す必要があったが、テロメラーゼを単離した後の溶解物中にDNAが残っていた為、この仮説は否定せざるを得なかった(実施例4)。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

本研究で用いられる磁気粒子は、DNA単離用に開発されたものを除けば、芳香族エポキシドモノマーで被覆されており、親水性表面を有している為、一般に、生体分子を固定することができる。この親水性表面によって、捕捉された酵素の変性が抑えられ、時間経過に伴う酵素活性の失活が抑制される為、疎水性表面に比べて有用である。本発明者らは、いかなる説明による限定も受けたくはないが、可能性が高い説明として、テロメラーゼは、他のタンパク質、タンパク質複合体、およびRNA-タンパク質複合体と共に、テロメラーゼ複合体の非特異的結合を介して、磁気ビーズによって単離されたことが挙げられる(実施例6)。本発明者らはまた、このテロメラーゼ複合体単離法は、あらゆる種類のタンパク質、RNA、または複合体を単離するのに有用であり、固相表面の性質を変化させることによって設計できると考えている。TRAPEZEキットの溶解用バッファーには、0.5% CHAPS、1 mM EGTA、5 mM β -メルカプトエタノール、および0.1 mMベンズアミジンが含まれている。これにより、細胞は溶解するが、強力な変性成分を含有していない為、RNAとタンパク質の複合体はそのまま維持される。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0051

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0051】

例えば、EP-A-106873においてSintefが記載している様な超常磁性粒子が特に好適である。反応中に粒子が磁気によって凝集したり塊になったりするのを避けることができ、生物材料の均一な単離を確実にこなうことができるからである。本発明で使用するには、Dyna1 AS社(ノルウェーのオスロ)からDYNABEADS (登録商標)として販売されている既知の磁気粒子が、特に好適である。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0052

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0052】

本発明で使用する為に機能化されたコーティング粒子は、米国特許第4336173号、第4,459,378号、および第4,654,267号に記載されたビーズ修飾法によって調製することができる。即ち、ビーズまたは他の支持体は、例えば正または負に荷電したり、親水性または疎水性にする等、様々なタイプの機能化された表面を有する様、調製することができる。

【手続補正11】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0053

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0053】

異なる表面および支持体に対し、様々な分子成分は、様々な程度の非特異的結合を示す。従って、結合条件を最適化し、例えば粒子濃度等、所定の系に最適な支持体の面積を決定する為には、単位体積当たりの固相支持体の量(例えば粒子の数)を「滴定」することが有利である。

【手続補正12】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0054

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0054】

細胞試料、即ち、単離細胞または支持体に結合した細胞を溶解することにより、テロメラゼ複合体を含む上記成分を遊離させる。細胞を溶解する方法は、当該技術分野において公知であり、文献中に広く記載されているので、公知の如何なる方法を使用しても良い。試料のタイプや細胞が異なれば、異なる方法を用い

た方が適切であると考えられるが、標的成分の生物活性を維持する為には、適切なバッファーおよび機械的溶解による適切な溶解法を使用することが重要である。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

本発明の方法を実施する為に、液体試料の遠心分離、生検針、頬側切屑等の如き何らかの方法で細胞を単離することができるが、好ましくは、本発明法では通常、固体支持体を用いて細胞を濃縮し、支持体に結合した細胞を、残りの試料部分から適宜採取または分離することにより、細胞を濃縮することができる。この様に細胞結合工程は、細胞を濃縮、及び／又は最初の試料よりも少量に濃縮する為に行なわれる。次に、所望の溶解剤を含む適切な溶解用バッファーを加えたり、単離した細胞を所望の溶解状態におくことにより、可溶化を適宜行なうことができる。例えば、適切な溶解剤を含む溶解用バッファーを単に加えるだけの場合には、単離した細胞を適切な時間、溶解用バッファー中でインキュベートし、例えば、テロメラーゼ等の標的成分の生物活性を破壊することなく可溶化が行なわれる様にすればよい。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0077

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0077】

1×CHAPS溶解用バッファー：

0.5% CHAPS

10% グリセロール

TRAP反応混合液：

20mM トリス塩酸pH8.3

10mM トリス塩酸 pH7.5	1.5mM	MgCl ₂
1mM MgCl ₂	63mM	KCl
1mM EGTA	0.05%	Tween20
5mM β-メルカプトエタノール	1mM	EGTA
0.1mM ベンズアミジン		50 μM dNTPs
	2 μCi	³² P-dCTPおよび ³² P-TTP
10×TRAP反応バッファー	0.1 μg	TSオリゴヌクレオチド
200mM トリス塩酸 pH8.3	0.5 μM	T4遺伝子32タンパク質(USB)
	(1 μg)	
15mM MgCl ₂	2ユニット	Taqポリメラーゼ
630mM KCl		
0.5% Tween20		
10mM EGTA		
0.1% ウシ血清アルブミン(BSA)		
50×dNTP混合液=dATP、dTTP、dGTP、dCTPが夫々2.5 mM		

図3は、このテロメラーゼ活性検出法の為にオリゴヌクレオチドを放射性標識しなかったときの検出限界は、およそ40～50個のくらいのSW480細胞であることを示している。本実施例において、予想したほどのテロメラーゼ活性を示さなかった100細胞の試料を除けば、細胞数が増すにつれてテロメラーゼ陽性のバンドの強度が増す。TRAPEzeキットの製造業者(オンコー社、米国)は、彼らの資料の中で、80個のテロメラーゼ陽性細胞の抽出物におけるテロメラーゼ活性を示している。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0078

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0078】

実施例2:磁気ビーズによるテロメラーゼ活性の単離

本実験では、テロメラゼアッセイを行なう前に、培養癌細胞を抗体被覆ビーズと結合させた(TRAPEzeキット、オンコー社、米国)。これは、細胞株SW480が、ビーズ上のBerEP4抗体によって抗上皮ダイナビーズ(登録商標)に結合する為、細胞の免疫磁気分離をシミュレートした。磁気ビーズ上に捕捉された細胞を可溶化し、ビーズを溶解物から分離した。ビーズ画分と残りの溶解物についてテロメラゼ活性を調べた。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0079

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0079】

方法

SW480培養細胞1000個をPBSで2回洗浄してから、4℃で10分間、600gで回収し、氷冷した洗浄用バッファーに懸濁して、再び遠心した。異なったタイプの磁気ビーズ(ダイナビーズ(登録商標))、抗体被覆ダイナビーズ(登録商標)M-450または抗体被覆ダイナビーズ(登録商標)M-280を用いた。この実験では、ダイナビーズ(登録商標)抗上皮細胞(M-280)を用いた。これらのビーズを細胞に加えてから、20 μ lの氷冷CHAPS溶解用バッファーに懸濁した。ダイナルMPC-Eを用いて、チューブの壁に磁気ビーズを集める前に、氷浴上で25~30分間インキュベートした。溶解物を新しいチューブに移して、ビーズを40 μ lの氷冷CHAPS溶解用バッファーに懸濁した。

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0080

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0080】

テロメラゼアッセイを行う為に、実施例1に記載されている通りに混合液を

調製した。

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0081

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0081】

TSプライマーをテロメラーゼによって伸長させる為に30℃で30分間インキュベートした。

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0082

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0082】

伸長した後、引き続き増幅処理を行ない、94℃で90秒、その後、94℃で30秒間、60℃で30秒間を30回繰り返した。

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0083

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0083】

12.5%のアクリルアミドゲルによる電気泳動で、PCR産物を分離した。

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0084

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0084】

結果

同じ量のテロメラゼ陽性SW480細胞(1000個)を磁気ビーズ(ダイナビーズ(登録商標)M-280抗上皮細胞)存在下で溶解した。ただし、100万、1000万または2000万個の磁気ビーズを用いた。TRAPアッセイの前に、磁石をチューブ(Dyna1 MPC-E)の壁につけて使用することによって試料からビーズを取除き、溶解物を新しいチューブに移した。このビーズをCHAPS溶解用バッファーに懸濁した。図4に示す様に、ビーズ画分と、残りの溶解物の両者のテロメラゼ活性を調べた。陽性のテロメラゼシグナルは、ビーズ画分でのみ見られ、最も良好な結果は、2000万個のビーズを用いたときに得られた。

【手続補正22】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0085

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0085】

結論

本発明者らは、TRAPeze溶解用バッファーで細胞を溶解すると、テロメラゼ複合体は、直接的または間接的に、驚くほどよく磁気ビーズに結合すると結論づけた。テロメラゼアッセイ法の前に磁気ビーズを除去すると、活性は検出されなかった(結果は示していない)。テロメラゼを磁気ビーズ上に捕捉すると、酵素複合体の生物活性は破壊されなかった。このことは、磁気ビーズを用いてテロメラゼを単離することによって、テロメラゼ活性を調べることができ、TRAP試験の前にインヒビターを含む溶解物を除去できることを意味する。テロメラゼ複合体の捕捉は、1000個のSW480培養細胞を用い、2000万個のダイナビーズ(登録商標)(300 μ g)を用いたときに最も良好な結果が得られた。

【手続補正23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0086

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0086】

実施例3:ダイナビーズ（登録商標）DNA DIRECTを用いたテロメラーゼ複合体の単離

実施例2では、抗体被覆磁気ビーズを用いてテロメラーゼを単離した。本実施例では、溶解物からゲノムDNAを直接単離する為に設計された非被覆ダイナビーズ（登録商標）を用いた。さまざまな量のダイナビーズ（登録商標）DNA DIRECT（ノルウェー、オスロ、ダイナル社）を用いて、2000個のSW480細胞からテロメラーゼ活性を単離した。実施例2と同じ方法を用いた。

【手続補正24】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0087

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0087】

結論

DNA単離に通常用いられる非被覆磁気ビーズによって、細胞溶解物からテロメラーゼ複合体を単離することができる。2000個の細胞に対して、テロメラーゼ単離に用いるDNA DIRECTビーズの最適量は2000～3000万個または300～450 μ gの間である。

【手続補正25】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0088

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0088】

実施例4:非被覆エポキシドビーズによるテロメラーゼの単離

本実施例では、溶解物中のテロメラーゼとの結合について、表面にエポキシド

ポリマーを有する非被覆ダイナビーズ（登録商標）を調べた。これらのビーズは、実際に抗体被覆ビーズを作製する為に用いられているので、抗体なしのビーズが、テロメラーゼ複合体を単離する為に使用できるか否かを調べるのが目的であった。2,000個の細胞を、さまざまな量のエポキシドビーズ（ $4.5\mu\text{m}$ のダイナビーズ（登録商標）を $150\sim 400\mu\text{g}$ の範囲で）と共に、 $40\mu\text{l}$ の $1\times\text{CHAPS}$ 溶解用バッファーで溶解した。氷浴上で30分間インキュベートした後、溶解物からビーズを分離し、実施例2の記載に従い、TRAP混合液を加える前に $40\mu\text{l}$ の溶解用バッファーに再懸濁した。

【手続補正26】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0089

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0089】

図6は、ビーズが $200\mu\text{g}$ から $400\mu\text{g}$ の範囲にあるとき、TRAPアッセイにおけるPCR産物のシグナル強度がどの程度まで概ね一致しているかを示している。 $100\mu\text{g}$ のビーズを用いたレーンのシグナル強度は予想されたほど強くはなかったが、これは、おそらく、この実験で単離をしている間に細胞が失われたせいであろう。

【手続補正27】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0090

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0090】

結論

本実施例では、 $200\mu\text{g}$ 以上のビーズを用いたとき、すべてのテロメラーゼ複合体がビーズに結合したことを示している。或いは、 $200\mu\text{g}$ 以上のビーズを用いると、十分なテロメラーゼが単離され、それによって、PCRを飽和させるのに十分なテンプレートが産生されることを説明している。テロメラーゼ活性が比較的高

い細胞を用いて、ただし、大まかにいえば、細胞当たり最低でもおよそ $0.1\mu\text{g}$ のエポキシダイナビーズ（登録商標）を用いているはずであるが、強力なTRAPアッセイPCRシグナルを生じさせるのに必要な、全量または十分な量のテロメラーゼ複合体が単離されることを確認した。後の実施例では、 $400\mu\text{g}$ の磁気ビーズを用いた。

【手続補正28】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0091

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0091】

実施例5:テロメラーゼは、DNAへの結合によって間接的に単離されるのか。

【手続補正29】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0092

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0092】

テロメラーゼ複合体が固相に結合するメカニズムに関する元々の仮説は、染色体DNAを介して間接的に結合するというもの、すなわち、ビーズが、テロメラーゼ複合体とともにクロマチン構造の一部として、ゲノムDNAにクロマチンの形で結合するというものである。この仮説を確認する為、磁気ビーズから溶出した物質及び溶解物画分から精製した物質にゲノムDNAが存在するかを、PCR増幅によって調べた。

【手続補正30】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0093

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0093】

方法

テロメラーゼ複合体を単離する為の実施例2のプロトコールを用いた。本実施例では、実施例4と同じ方法で非被覆エポキシドダイナビーズ（登録商標）を用いた。さまざまな量のSW480細胞を調べた。各ビーズ画分を $40\mu\text{l}$ の水に再懸濁し、磁気ビーズに結合した成分を溶出する為に 65°C で5分間インキュベートした。残った溶解物については、ドイツのキアゲン社(Qiagen)から市販されているキットであるQIAamp血液キットとその推奨プロトコールを用いてゲノムDNAを単離した。

【手続補正31】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0094】

結果

ビーズ画分を調べたところ(図7)、出発材料として100個から100,000個の細胞を用いた一連の試料では、GAPDH遺伝子のPCR産物を生成することができなかった。しかし、残った溶解物からの材料を試験すると、すべての試料で陽性のPCRシグナルが見られた。

【手続補正32】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0095

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0095】

結論

ビーズ画分を調べたレーンではシグナルが見られず、残った溶解物を調べたときに陽性のシグナルが見られたことは、染色体DNAはビーズに結合せず、溶解物

に残っていることを証明しているにちがいない。これらの結果は、染色体DNAがビーズに結合しても、テロメラーゼ複合体は単離されないことを示している。染色体DNAを介して間接的にテロメラーゼが結合するという仮説は、こうして否定された。

【手続補正33】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0096

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0096】

実施例6: 固相テロメラーゼ単離のメカニズム: タンパク質およびタンパク質-RNA複合体の磁気ビーズに対する非特異的結合

タンパク質またはタンパク質-RNA複合体の磁気ビーズに対する非特異的結合によってテロメラーゼが単離される、というのが、どの様にしてテロメラーゼが磁気ビーズによって単離できるのかというメカニズムを説明する為に提案した次の仮説である。実施例2で記載したプロトコルに従い、SW480細胞を出発材料に用いて、テロメラーゼ複合体を単離した。ビーズから熱溶出した後、タンパク質を分離して、SDS-PAGEとそれに続く銀染色を用いて可視化した。

【手続補正34】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0097

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0097】

方法

磁気ビーズに結合するタンパク質を解析する為に、以下のプロトコルを用いた。PBSに再懸濁した300 μ gのダイナビーズ（登録商標）抗上皮細胞を、SW480細胞の懸濁液に加えた。0.1% BSAを含むPBSによって全容量を1 mlに調整し、完全に混合する為、4℃で約15分間、ローラーの上に載せておいた。チューブをMPCに

2分間置き、ビーズ/細胞複合体をチューブ壁に移動させた。上清を取り出して捨てた。

【手続補正35】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0098

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0098】

チューブを65℃の環境下に5分間置き、ビーズからビーズに結合した成分を溶出した。再びチューブを磁石の中に入れてビーズを集め、溶出液を移した。チューブをMPCから取り出して、1 mlのPBSを加えて、ビーズと細胞の複合体を再懸濁した。細胞が付着したビーズを再び磁石で集めて、洗浄を2回繰り返した。再懸濁したビーズと細胞の複合体をきれいなチューブに移してから、最後の洗浄を行う為にMPCに入れた。

【手続補正36】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0099

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0099】

100 μ gの非被覆エポキシドビーズを40 μ lの1×CHAPS溶解用バッファーと混合した後、ピペッティングによって、ビーズと細胞の複合体と混合した。チューブを氷上で30分間インキュベート、完全に溶解した。

【手続補正37】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0100

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0100】

磁石を用いてビーズを集め、ビーズ画分を $10\mu\text{l}$ の 10 mM トリス塩酸で懸濁した。

【手続補正38】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0101

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0101】

ファストシステム(PhastSystem)(スウェーデン、ファルマシアバイオテックAB社)は、分子量を測定し、ポリペプチドを解析する為のSDS-PAGEシステムである。ゲルにロードする前に、 $2\mu\text{l}$ の5×Redバッファーを各溶出物 $8\mu\text{l}$ に加えた。タンパク質を変性する為に、この混合液を含むチューブを 100°C の環境下に5分間置いた。この段階で、SDSと β -メルカプトエタノールを添加することにより、タンパク質は、各ポリペプチドサブユニットに解離した。チューブは、サンプルをゲルにロードするまで氷浴上に保存した。タンパク質は、定電圧および一定のpHで電気泳動を行ない、10~15%の勾配(gradient)ゲル上で分離した。

【手続補正39】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0102

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0102】

ゲル上のタンパク質を可視化する為にファストゲルシルバーキット(PhastGel Silver Kit)(スウェーデン、ファルマシアバイオテックAB社))を用いた。銀染色を用いれば、タンパク質の濃度が $0.3\sim 0.5\text{ ng}/\mu\text{l}$ と低くても検出することができる(HeukenshovenおよびDemick, 1988)。

【手続補正40】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0111

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0111】

2000万個のダイナビーズ（登録商標）抗上皮細胞（300 μ g）を試料に加え（打ち込まれた血液試料と打ち込まれていない血液試料）、回転ミキサーを用い、4℃で30分間連続して混合した。磁石（Dyna1 MPC-Q）を用いて、捕捉した細胞を集め、PBSで3回洗浄した。60 μ gのダイナビーズ（登録商標）DNA DIRECT（2.8 μ mのビーズ400万個）を含む25ClのCHAPS溶解用バッファーを、捕捉した細胞を有する磁気ビーズ画分に加えた。氷浴上で25～30分間インキュベートしてから、MPC-Eによってチューブの壁にすべての磁気ビーズを集めた。溶解物を捨て、ビーズを氷冷した40ClのCHAPS溶解用バッファーに再懸濁した。

【手続補正41】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0112

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0112】

テロメラーゼアッセイを行なう為、実施例1の記載に従って混合液を調製した。

【手続補正42】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0113

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0113】

TSプライマーをテロメラーゼによって伸長させる為、30℃で30分間インキュベーションした。

【手続補正43】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 1 1 4

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 1 1 4】

伸長に引続いて増幅処理を行ない、94℃で30秒間、60℃で30秒間を30回繰返した。

【手続補正44】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 1 1 5

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 1 1 5】

12.5%のアクリルアミドゲル上での電気泳動によるPCR産物を分離した。

【手続補正45】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 1 1 6

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 1 1 6】

結果

固定した癌細胞をCHAPS溶解用バッファーで溶解し、磁石でビーズを集めて、テロメラーゼ複合体を単離した。本発明者らは、本実施例において、免疫磁気ビーズと非被覆ビーズとを併用した。溶解物を除去したところ、試験したすべての場合に陰性であることが分かった。そこで本発明者らは、実施例2の記載に従って、ルーチンのビーズ画分だけを調べた。本発明者らによる、循環性癌細胞を磁気ビーズによって単離する為のプロトコールに従ったところ、正常な血液試料(打ち込んでいない)では活性が見られなかった(図10、レーン1)。テロメラーゼ活性を有することを証明する弱いシグナルが、40個の癌細胞を含む血液試料中で見られた(レーン2)。50個から500個の癌細胞を含む血液試料中では、強いシグナ

ルが見られた(レーン3~6)。陽性対照と陰性対照は予想通りであった(レーン7~8)。レーン1にシグナルが見られないことから、癌細胞を濃縮する本発明法によって、幹細胞やリンパ球の様にテロメラーゼ活性を有する他の細胞が充分除去されていることが分かる。

【手続補正46】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0117

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0117】

結論

本発明者らは、血液1 ml当たり癌細胞10個、または正常細胞100万個当たり癌細胞2~3個というアッセイ感度を実証した。これは、サイトケラチン19mRNAのネステッド(nested) RT-PCRと組合わせた免疫磁気濃縮法を用いる微小転移巣検出で示された感度と同じ感度である(Borgnesら、1996)。後者のアッセイ法により、血液中に上皮細胞が存在することが証明されるものの、これが癌細胞なのか、正常な上皮細胞なのかは証明されておらず、また、この検査は予後的な価値を有していない。テロメラーゼアッセイ法を用いる利点は、診断的な価値と、恐らく予後的な価値があり得ること、及びコンタミネーションのリスクに関して問題の多いことで知られるネステッドRT-PCRを回避できることである。

【手続補正47】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0118

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0118】

実施例9:胸膜中の微小転移巣細胞の検出

上記の実施例はすべて、モデル系で行われたものであり、様々な方法のパラメータについて調べた。従って、乳癌患者から採取した試料について、開発した方

法を試験したときは、非常に胸を躍らせた。

【手続補正48】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0119

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0119】

方法

本実施例で検査した12.5 mlの胸膜試料中には、テロメラーゼも低量発現している600万個のリンパ球が入っていた(Blascoら、1995; Hiyama K.ら、1995; Chiura、1996)。この患者は、胸膜中に循環性癌細胞を保有している可能性が高かった(Gunnar Kvalheim博士からの私信)が、癌細胞の量は分からなかった。実施例8と同様に、癌細胞を濃縮する為に2000万個のダイナビーズ(登録商標)抗上皮細胞を加えた。ダイナビーズ(登録商標)抗上皮細胞では捕捉できないテロメラーゼ発現リンパ球癌細胞の存在を明らかにする為に、胸膜に残っている細胞を400 μ gのエポキシドビーズ入りの1×CHAPS溶解用バッファーで溶解した。実施例2及び8に記載されているプロトコールに従った。

【手続補正49】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0120

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0120】

結果

図11は、胸膜の濃縮細胞集団中でテロメラーゼが検出されたことを示している。この濃縮集団の溶解画分にもいくつかの活性が見られたが、それは、添加したビーズの数が、この強力なテロメラーゼ活性に対して少な過ぎたことを示すものである。

【手続補正50】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0144

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0144】

この洗浄液を4℃で10分間、250gで遠心分離し、上清を注意深く捨てる。沈殿物を10分の1容量の氷冷した懸濁用溶液に懸濁する(上記と同じ)。

【手続補正51】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0145

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0145】

細胞懸濁液1 ml当たり5～1000万のダイナビーズ(登録商標) BerEP4(4.5(M))を加える。ビーズはPBSに懸濁してもよい。

【手続補正52】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0146

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0146】

回転体上で試料を4℃でインキュベートし、磁気ビーズへ細胞の抗体-抗原固定を行わせる。

【手続補正53】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0147

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0147】

固定された細胞を、磁石 (Dyna1 MPC)によってチューブ壁に集め、上清を取り出して捨てる。

【手続補正54】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0148

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0148】

細胞-ビーズ複合体を2分間ゆっくり攪拌してPBSで洗浄し、磁石によって回収し、洗浄溶液を捨てる。

【手続補正55】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0149

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0149】

洗浄溶液の茶色が見られなくなるまで、洗浄工程を数回繰り返す。

【手続補正56】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0150

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0150】

固定した細胞を、十分量のビーズ存在下で、CHAPS溶解用バッファー(実施例1)中で溶解する。通常、DNA DIRECT磁気ビーズを加えると、量が倍になる。

【手続補正57】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0151

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0151】

テロメラーゼ複合体を持つビーズを、磁石によってチューブ壁に集める。単離された材料はテロメラーゼアッセイに使用することができる。

実施例13:テロメラーゼの単離法とテロメラーゼアッセイ法を組合わせた、尿および痰／頬スワブから上皮細胞を単離する方法

尿中の剥脱細胞を解析すると、膀胱癌患者の62%においてテロメラーゼ活性が検出されたが、悪性でない尿試料83個のうち3個の試料でも弱いシグナルが見られた(Yoshidaら、1997b)。遠心分離によって、50 mlの尿から剥脱細胞を集めた。本実施例で説明する方法では、尿、痰、または他の体液からの剥脱細胞を集める為、上皮細胞に対する抗体で被覆した免疫磁気ビーズを使用する。この方法の利点は、バクテリアや残渣の様な干渉物質を除去できる点である。磁気ビーズによって細胞溶解物からテロメラーゼ複合体を単離し、溶解物の残りを除去した後、解析する。

【手続補正58】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0152

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0152】

尿細胞試料の調製:

尿、好ましくは、その日初めての尿を採取し、氷上で冷却する。

【手続補正59】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0153

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0153】

3000万個のダイナビーズ（登録商標）BerEP4(または、その他の抗上皮抗体)を

尿に加える。試料を5～20分間回転させ、細胞を固定化する。

【手続補正60】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0154

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0154】

捕捉した細胞を有する磁気ビーズを、強力な磁石(Dyna1 MPC)で集めてから、尿を注意深く捨てる。

【手続補正61】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0155

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0155】

細胞-ビーズ複合体を冷PBSで2回洗浄し、テロメラーゼを単離する。

【手続補正62】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0156

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0156】

痰細胞試料の調製：

唾液または痰を瓶に集めて、実施例5の懸濁液のような粘液溶解因子を含む氷冷等張液で希釈する。試料を採取する数時間前は食事をさせないこと。呼吸器系を調べる為に、粘液-毛様体を一掃するかせき込む前に口腔を水で洗浄する。

【手続補正63】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0157

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0157】

唾液または痰が十分に希釈されて粘性が低下したことを確認した後、BerEP4で被覆した免疫磁気ビーズ(好ましくは $4.5\mu\text{M}$)を加える(3000万個)。試料を5～20分間回転させて細胞を固定化する。

【手続補正64】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0158

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0158】

捕捉した細胞を有する磁気ビーズを、強力な磁石(Dyna1 MPC)で集め、唾液／痰を注意深く捨てる。

【手続補正65】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0159

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0159】

細胞-ビーズ複合体を冷PBSで2回洗浄し、テロメラーゼを単離する。

【手続補正66】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0160

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0160】

テロメラーゼの単離：

この様にして固定した細胞を、十分な量のビーズ存在下、CHAPS溶解用バッフ

ァー(実施例1)中で溶解する。DNA DIRECT磁気ビーズを加えると、通常、量が倍になる。

【手続補正67】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0161

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0161】

テロメラーゼ複合体を有するビーズを、磁石でチューブ壁に集める。この様にして単離された材料は、テロメラーゼアッセイに使用することができる。

【手続補正68】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0162

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0162】

引用文献

Asai, A.; Kiyozuka, Y.; Yoshida, R.; Fujii, T.; Hioki, K.; Tsubura, A. (1998)

Telomere length, telomerase activity and telomerase RNA expression in human esophageal cancer cells: Correlation with cell proliferation, differentiation and chemosensitivity to anticancer drugs. *Anticancer Res.* 18: 1465-1472.

Avilion, A.A.; Piatyszek, M.A.; Gupta, J.; Shay, J.W.; Bacchetti, S.; Greider, C.W. (1996) Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res.* 56: 645-650.

Bacchetti, S. and Counter, C.M. (1995). Telomeres and telomerase in human cancer. *Int. J. Oncol.* 7: 423-432.

Bestilny, L.J.; Brown, C.B.; Miura, Y.; Robertson, L.D.; Riabowol, K.T.

(1996)

Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines. *Cancer Res.* 56: 3796-3802.

Bisoffi, M.; Chakerian, A.E.; Fore, M.L.; Bryant, J.E.; Hernandez, J.P.; Moyzis, R.K.; Griffith, J.K. (1998)

Inhibition of human telomerase by a retrovirus expressing telomeric antisense RNA. *Eur. J. Cancer* 34: 1242-1249.

Blasco, M.A.; Funk, W.; Villeponteau, B.; Greider, C.W. (1995) Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 269: 1267-1270

Blasco, M.A.; Rizen, M.; Greider, C.W.; Hanahan, D. (1996) Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis. *Nature Genet.* 12: 200-204.

Blasco, M.A.; Lee, H.-W.; Hande, M.P.; Samper, E.; Landsdorp, P.M.; DePinho, R.A.; Greider, C.W. (1997)

Telomere shortening and tumour formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91: 25-34.

Bodnar, A.G.; Ouellette, M.; Frolkis, M.; Holt, S.E.; Chiu, C.-P.; Morin, G.B.; Harley, C.B.; Shay, J.W.; Lichtsteiner, S.; Wright, W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352.

Science 279: 349-352.

Borgnes, A.; Neurater, A.; Kullmann, A.; Deggerdal, A.; Lycke, K.; Larsen, F. (1996) Detection of isolated colon carcinoma cells in peripheral blood- or bone marrow mononuclear cell suspensions.

Poster (Micrometastasis II), Munchen, June 1996.

Bosnes, M.; Deggerdal, A.; Rian, A.; Korsnes, L.; Larsen, F. (1997) Magnetic separation in molecular biology. Scientific and clinical applicatio

ns of magnetic carriers. Hafeli et al (ed). Plenum Press, New York.

Brien, T.P.; Kallakury, B.V.S.; Lowry, C.V.; Ambros, R.A.; Muraca, P.J.; Malfetano, J.H.; Ross, J.S. (1997)

Telomerase activity in benign endometrium and endometrial carcinoma. *Cancer Res.* 57: 2760-2764.

Broccoli, D.; Young, J.W.; de Lange, T. (1995) Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9082-9086.

Bryan, T.M.; Marusic, L.; Bacchetti, S.; Namba, M.; Reddel, R.R. (1997) The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. *Hum. Mol. Gen.* 6: 921-926.

Burger, A.M.; Double, J.A.; Newell, D.R. (1997) Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. *Eur. J. Cancer* 33: 638-644.

Califano, J.; Ahrendt, S.A.; Meiningen, G.; Westra, W.H.; Koch, W.M.; Sidransky, D. (1996) Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Res.* 56: 5720-5722.

Chadaneau, C.; Hay, K.; Hirte, H.W.; Gallinger, S.; Bacchetti, S. (1995) Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 55: 2533-2536.

Chiu, C.-P.; Dragowska, W.; Kim, N.W.; Vaziri, H.; Yui, J.; Thomas, T.E.; Harley, C.B.; Lansdorp, P.M. (1996)

Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow.

Stem Cells 14: 239-248.

Chong, L.; van Steensel, B.; Broccoli, D.; Erdjument-Bromage, H.; Hanish

- , J.; Tempst, P.; de Lange, T. (1995)
A human telomeric protein. *Science* 270: 1663-1667.
- Collins, K. and Greider, C.W. (1993) Tetrahymena telomerase catalyzes nucleocyctic cleavage and nonprocessive elongation.
Genes Dev. 7: 1364-1376.
- Collins, K.; Kobayashi, R.; Greider, C.W. (1995) Purification of Tetrahymena telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. *Cell* 81: 677-686.
- Counter, C.M.; Avilion, A.A.; LeFeuvre, C.E.; Stewart, N.G.; Greider, C.W.; Harley, C.B.; Bacchetti, S. (1992)
Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity.
EMBO J. 11: 1921-1929.
- Counter, C.M.; Gupta, J.; Harley, C.B.; Leber, B.; Bacchetti, S. (1995)
Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85: 2315-2320.
- Cunningham, V.J.; Markham, N.; Shroyer, A.L. (1998) Detection of telomerase expression in fine-needle aspirations and fluids. *Diagn. Cytopathol.* 18: 431-436.
- Duggan, B.D.; Wan, M.; Yu, M.C.; Roman, L.D.; Muderspach, L.I.; Delgadillo, E.; Li, W.-Z.; Martin, S.E.; Dubeau, L. (1998) Detection of ovarian cancer cells: Comparison of a telomerase assay and cytologic examination. *J. Natl. Cancer Inst.* 90: 238-242.
- Eaton, M.C.; Hardingham, J.E.; Kotasek, D.; Dobrovic, A. (1997) Immunobead RT-PCR: A sensitive method for detection of circulating tumour cells. *BioTechniques* 22: 100-105.
- Edington, K.G.; Loughran, O.P.; Berry, I.J.; Parkinson, E.K. (1995)
Cellular immortality: a late event in the progression of human squamous cell carcinoma of the head and neck associated with p53 alteration and a

high frequency of allele loss. *Mol. Carcinog.* 13: 254-265.

Engelhardt, M.; Kumar, R.; Albanell, J.; Pettengell, R.; Han, E.; Moore, M.A.S. (1997)

Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood* 90: 182-193.

Feng, J.; Funk, W.D.; Wang, S.-S.; Weinrich, S.L.; Avilion, A.A.; Chiu, C.-P.; Adams, R.R.; Chang, E.; Allsopp, R.C.; Yu, J.; Le, S.; West, M.D.; Harley, C.B.; Andrews, W.H.; Greider, C.W.; Villeponteau, B. (1995)

The RNA component of human telomerase. *Science* 269: 1236-1241.

Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43: 405-413.

Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1987) The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51: 887-898.

Greider, C.W. and Blackburn, E.H. (1989) A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337: 331-337.

Greider, C.W. (1996) Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 337-365.

Hardingham, J.E.; Kotasek, D.; Farmer, R.N.; Butler, J.-X.; Sage, R.E.; Dobrovic, A. (1993) Immunobead-PCR: a technique for the detection of circulating tumor cells using immunomagnetic beads and the polymerase chain reaction.

Cancer Res. 53: 3455-3458.

Hardingham, J.E.; Kotasek, D.; Sage, R.E.; Eaton, M.C.; Pascoe, V.H., Dobrovic, A. (1995) Detection of circulating tumour cells in colorectal cancer by immunobead-PCR is a sensitive prognostic marker for relapse of disease.

Mol. Med. 1: 789-794.

Harle-Bachor, C. and Boukamp, P. (1996) Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6476-6481.

Harley, C.B.; Futcher, A.B.; Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.

Nature 345: 458-460.

Harley, C.B. (1991) Telomere loss: mitotic clock or genetic bomb? Mutat. Res. 256: 271-282.

Harley, C.B. (1995) Telomeres and aging. Telomeres, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 247-263.

Harley, C.B. and Villeponteau, B. (1995) Telomeres and telomerase in aging and cancer.

Curr. Opin. Genetics Dev. 5: 249-255.

Harrington, L. and Greider, C.W. (1991) Telomerase primer specificity and chromosome healing.

Nature 353: 451-454.

Harrington, L.; McPhail, T.; Mar, V.; Zhou, W.; Oulton, R.; Program, A.E.S.T.; Bass, M.B.; Arruda, I.; Robinson, M.O. (1997) A mammalian telomerase-associated protein. Science 275: 973-977.

Hayflick, L. (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 37: 614-636.

Heine, B.; Hummel, M.; Muller, M.; Heicappell, R.; Miller, K.; Stein, H. (1998) Non-radioactive measurement of telomerase activity in human bladder cancer, bladder washings, and in urine. J. Pathol. 184: 71-76.

Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. Electrophoresis 9: 28-33.

Hiyama, E.; Hiyama, K.; Yokoyama, T.; Matsuura, Y.; Piatyszek, M.A.; Shay, J.W. (1995a)

Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nature Med.* 1: 249–255.

Hiyama, E.; Yokoyama, T.; Tasumoto, N.; Hiyama, K.; Imamura, Y.; Murakami, Y.; Kodama, T.; Piatyszek, M.A.; Shay, J.W.; Matsuura, Y.; (1995b) Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res.* 55: 3258–3262.

Hiyama, E.; Hiyama, K.; Tatsumoto, N.; Kodama, T.; Shay, J.W.; Yokoyama, T. (1996a)

Telomerase activity in human intestine. *Int. J. Oncol.* 9: 453–458.

Hiyama, E.; Gollahon, L.; Kataoka, T.; Kuroi, K.; Yokoyama, T.; Gazdar, A.F.; Hiyama, K.; Piatyszek, M.A.; Shay, J.W. (1996b) Telomerase activity in human breast tumours. *JNCI* 88: 116–122.

Hiyama, K.; Hirai, Y.; Kyoizumi, S.; Akiyama, M.; Hiyama, E.; Piatyszek, M.A.; Shay, J.W.; Ishioka, S., Yamakido, M. (1995) Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 155: 3711–3715.

Hohaus, S.; Voso, M.T.; Barbera, E.O.-L.; Cavallo, S.; Bellacosa, A.; Rutella, S.; Rumi, C.; Genuardi, M.; Neri, G.; Leone, G. (1997) Telomerase activity in human hematopoietic progenitor cells. *Haematologica* 82: 262–268.

Holt, S.E.; Shay, J.W.; Wright, W.E. (1996a) Refining the telomere–telomerase hypothesis of aging and cancer.

Nature Biotechnol. 14: 836–839.

Holt, S.E.; Wright, W.E.; Shay, J.W. (1996b) Regulation of telomerase activity in immortal cell lines.

Mol. Cell Biol. 16: 2932–2939.

Hsiao, R.; Sharma, H.S.; Ramakrishnan, S.; Keith, E.; Narayanan, R. (199

7)

Telomerase activity in normal human endothelial cells. *Anticancer Res.* 17: 827-832.

Kanaya, T.; Kyo, S.; Takakura, M.; Ito, H.; Namiki, M.; Inoue, M. (1998) hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 78: 539-543.

Kannan, S.; Tahara, H.; Yokozaki, H.; Mathew, B.; Nalinakumari, K.R.; Nair, M.K.; Tahara, E. (1997)

Telomerase activity in premalignant and malignant lesions of human oral mucosa.

Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 6: 413-420.

Kavaler, E.; Landman, J.; Chang, Y.; Droller, M.J.; Liu, B.C.-S. (1998) Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity. *Cancer* 82:708-714.

Kilian, A.; Bowtell, D.D.L.; Abud, H.E.; Hime, G.R.; Venter, D.J.; Keese, P.K.; Duncan, E.L.; Reddel, R.R.; Jefferson, R.A. (1997) Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum. Mol. Gen.* 6: 2011-2019.

Kim, N.W.; Piatyszek, M.A.; Prowse, K.R.; Harley, C.B.; West, M.D.; Ho, P.L.C.; Coviello, G.M.; Wright, W.E.; Weinrich, S.L.; Shay, J.W. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer.

Science 266: 2011-2015.

Kim, N.W., and Wu, F. (1997). Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucl. Acids Res.* 25: 2595-2597.

Kim, N.W. (1997) Clinical implications of telomerase in cancer. *Eur. J.*

Cancer 33(5): 781-786.

Kolquist, K.A.; Elliesen, L.W.; Counter, C.M.; Meyerson, M.; Tan, L.K.; Weinberg, R.A.; Haber, D.A.; Gerald, W.L. (1998) Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. *Nature Genet.* 19: 182-186.

Kvalheim, Gunnar – Clinical Stem Cell Laboratory, Norwegian Radium Hospital. Personal communication

Kyo, S.; Takakura, M.; Kohama, T.; Inoue, M. (1997) Telomerase activity in human endometrium.

Cancer Res. 57: 610-614.

Le, S.; Zhu, J.J.; Anthony, D.C.; Greider, C.W.; Black, P.M. (1998) Telomerase activity in human gliomas.

Neurosurgery 42: 1120-1125.

Leber, B. and Bacchetti, S. (1996) Telomeres and telomerase in normal and malignant haematologic cells.

Leuk. Lymphoma 24: 1-9.

Lee, M.S. and Blackburn, E.H. (1993) Sequence-specific DNA primer effects on telomerase polymerization activity.

Mol. Cell. Biol. 13: 6586-6599.

Lycke, K.; Kullmann, A.; Bosnes, M.; Larsen, F. (1997) Immunomagnetic enrichment of carcinoma cells from blood and bone marrow combined with RT-PCR for improved detection of micrometastasis. Poster (PCR in Oncology), Heidelberg, April 1997.

McClintock, B. (1941) The stability of broken ends of chromosomes in Zea mays. *Genetics* 26: 234-282.

Meyerson, M.; Counter, C.M.; Eaton, E.N.; Elliesen, L.W.; Steiner, P.; Caddle, S.D.; Ziaugra, L.; Beijersbergen, R.L.; Davidoff, M.J.; Liu, Q.; Bacchetti, S.; Haber, D.A.; Weinberg, R.A. (1997) hEST2, the putative hu

man telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. Cell 90: 785-795.

Morin, G.B. (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. Cell 59: 521-529.

Morin, G.B. (1991) Recognition of a chromosome truncation site associated with alpha-thalassaemia by human telomerase. Nature 353: 454-456.

Moyzis, R.K.; Buckingham, J.M.; Cram, L.S.; Dani, M.; Deaven, L.L.; Jones, M.D.; Meyne, J.; Ratliff, R.L.; Wu, J.-R. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6622-6626.

Muller, H.J. (1938) The remarking of chromosomes. The Collecting Net-Woods Hole 13: 181-198.

Muller, M.; Heine, B.; Heicappell, R.; Emrich, T.; Hummel, M.; Stein, H.; Miller, K. (1996)

Telomerase activity in bladder cancer, bladder washings and in urine. Int. J. Oncol. 9: 1169-1173.

Muller, M.; Krause, H.; Heicappell, R.; Tischendorf, J.; Shay, J.W.; Miller, K. (1998)

Comparison of human telomerase RNA and telomerase activity in urine for diagnosis of bladder cancer.

Clinical Cancer Research 4: 1949-1954.

Murakami, J.; Nagai, N.; Ohama, K.; Tahara, H.; Ide, T. (1997) Telomerase activity in ovarian tumors.

Cancer 80: 1085-1092.

Murakami, J.; Nagai, N.; Ohama, K. (1998) Telomerase activity in body cavity fluid and peritoneal washings in uterine and ovarian cancer. J. Int

. Med. Res. 26: 129-139.

Nakamura, T.M.; Morin, G.B.; Chapman, K.B.; Weinrich, S.L.; Andrews, W.H.; Ligner, J.; Harley, C.B.; Cech, T.R. (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277: 955-959.

Nakayama, J-i.; Saito, M.; Nakamura, H.; Matsuura, A.; Ishikawa, F. (1997) TLP1: A gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* 88: 875-884.

Naume, B.; Borgen, E.; Beiske, K.; Herstad, T.-K.; Ravnas, G.; Renolen, A.; Trachsel, S.; Thrane-Steen, K.; Funderud, S.; Kvalheim, G. (1997) Detection of isolated breast carcinoma cells in peripheral blood or bone marrow by immunomagnetic techniques. *J. Hematotherapy* 6: 103-114.

Neurater, A.; Edward, R.; Kilaas, L.; Ugelstad, J.; Larsen, F. (1998) Immunomagnetic separation of animal cells.

In *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 2nd edition. Celis, J.E. (editor), Academic Press: 197-204.

Norrback, K-F.; Dahlenborg, K.; Carlsson, R.; Roos, G. (1996) Telomerase activation in normal B lymphocytes and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 88: 222-229.

Olovnikov, A.M. (1973) A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* 41: 181-190.

Pelkey, T.J.; Frierson Jr., H.F.; Bruns, D.E. (1996) Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastasis from solid tumors. *Clin. Chem.* 42: 1369-1381.

Piatyszek, M.A., Kim, N.W., Weinrich, S.L., Hiyama, K., Hiyama, E., Wright, W.E. and Shay, J.W. (1995). Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol. *Meth. Cell. Sci.* 17: 1-15.

- Pluta, A.F.; Dani, G.M.; Spear, B.B.; Zakian, V.A. (1984) Elaboration of telomeres in yeast: Recognition and modification of termini from *Oxytricha* macronuclear DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1475-1479.
- Ramirez, R.D.; Wright, W.E.; Shay, J.W.; Taylor, R.S. (1997) Telomerase activity concentrates in active segments of human hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* 108: 113-117.
- Savoysky, E., Akamatsu, K., Tsuchiya, M. and Yamazaki, T. (1996). Detection of telomerase activity by combination of TRAP method and scintillation proximity assay. *Nucl. Acid Res.* 24: 1175-1176.
- Sharma, H.W.; Sokoloski, J.A.; Perez, J.R.; Maltese, J.Y.; Sartorelli, A.C.; Stein, C.A.; Nichols, G.; Khaled, Z.; Telang, N.T.; Narayanan, R. (1995) Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 12343-12346.
- Shay, J.W. and Wright, W.E. (1996) Telomerase activity in human cancer. *Curr. Op. Oncol.* 8: 66-71.
- Shay, J.W. and Bacchetti, S. (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* 33: 787-791.
- Sommerfeld, H.J.; Meeker, A.K.; Piatyszek, M.A.; Bova, G.S.; Shay, J.W.; Coffey, D.S. (1996) Telomerase activity: A prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res.* 56: 218-222.
- Suehara, N.; Mizumoto, K.; Kusumoto, M.; Niiyama, H.; Ogawa, T.; Yamaguchi, K.; Yokohata, K.; Tanaka, M. (1998) Telomerase activity detected in pancreatic juice 19 months before a tumor is detected in a patient with pancreatic cancer. *Am. J. Gastroenterol.* 93: 1967-1971.
- Sugino, T.; Yoshida, K.; Bolodeku, J.; Tahara, H.; Buley, I.; Manek, S.; Wells, C.; Goodison, S.; Ide, T.; Suzuki, T.; Tahara, E.; Tarin, D. (1996) Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesions: Diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle

aspirates. *Int. J. Cancer* 69: 301-306.

Sugino, T.; Yoshida, K.; Bolodeku, J.; Tarin, D.; Goodison, S. (1997) Telomerase activity and its inhibition in benign and malignant breast lesions. *J. Pathol.* 183: 57-61.

Sumida, T.; Sogawa, K.; Hamakawa, H.; Sugita, A.; Tanioka, H.; Ueda, N. (1998)

Detection of telomerase activity in oral lesions. *J. Oral Pathol. Med.* 27: 111-115.

Sun, D.; Hurley, L.H.; Von Hoff, D.D. (1998) Telomerase assay using biotinylated-primer extension and magnetic separation of the products. *BioTechniques* 25: 1046-1051.

Szostak, J.W. and Blackburn, E.H. (1982) Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29: 245-255.

Tahara, E.; Semba, S.; Tahara, H. (1996) Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin. Oncol.* 23: 307-315.

Taylor, R.S.; Ramirez, R.D.; Ogoshi, M.; Chaffins, M.; Piatyszek, M.A.; Shay, J.W. (1996)

Detection of telomerase activity in malignant and non-malignant skin conditions. *J. Invest. Dermatol.* 106: 759-765.

TRAPeze Telomerase Detection Kit Catalog #7700 Kit, 2nd edition, Oncor Inc.

Ulaner, G.A.; Hu, J.-F.; Vu, T.H.; Giudice, L.C.; Hoffman, A.R. (1998) Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternative splicing of hTERT transcripts.

Cancer Res. 58: 4168-4172.

van Steensel, B. and de Lange, T. (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1.

Nature 385: 740-743.

Vaziri, H.; Dragowska, W.; Allsopp, R.C.; Thomas, T.E.; Harley, C.B.; Lansford, P.M. (1994) Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9857-9860.

Vaziri, H. and Benchimol, S. (1998) Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biology* 8: 279-282.

Watson, J.D. (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New Biol.* 239: 197-201.

Weinrich, S.L.; Pruzan, R.; Ma, L.; Ouellette, M.; Tesmer, V.M.; Holt, S.E.; Bodnar, A.G.; Lichtsteiner, S.; Kim, N.W.; Trager, J.B.; Taylor, R.D.; Carlos, R.; Andrews, W.H.; Wright, W.E.; Shay, J.W.; Harley, C.B.; Morin, G.B. (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nature Genet.* 17: 498-502.

Weng, N.-p.; Levine, B.L.; June, C.H.; Hodes, R.J. (1996) Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. *J. Exp. Med.* 183: 2471-2479.

Weng, N.-p.; Levine, B.L.; June, C.H.; Hodes, R.J. (1997a) Regulation of telomerase RNA template expression in human T lymphocyte development and activation. *J. Immunol.* 158: 3215-3220.

Weng, N.-p.; Granger, L.; Hodes, R.J. (1997b) Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10827-10832.

Wright, W.E., Shay, J.W. and Piatyszek, M.A. (1995). Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acid Res.* 18: 3794-3795.

Wright, W.E.; Piatyszek, M.A.; Rainey, W.E.; Byrd, W.; Shay, J.W. (1996)

- Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* 18: 173-179.
- Xu, D.; Gruber, A.; Peterson, C.; Pisa, P. (1996) Suppression of telomerase activity in HL60 cells after treatment with differentiating agents. *Leukemia* 10: 1354-1357.
- Yang, C.-T.; Lee, M.-H.; Lan, R.-S.; Chen, J.-K. (1998) Telomerase activity in pleural effusions: Diagnostic significance. *J. Clin. Oncol.* 16: 567-573.
- Yasumoto, S.; Kunimura, C.; Kikuchi, K.; Tahara, H.; Ohji, H.; Yamamoto, H.; Ide, T.; Utakoji, T. (1996) Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* 13: 433-439.
- Yoshida, K.; Sugino, T.; Goodison, S.; Warren, B.F.; Nolan, D.; Wadsworth, S.; Mortensen, N.J.; Toge, T.; Tahara, E.; Tarin, D. (1997a) Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells in colonic luminal washings and its related clinical implications. *Br. J. Cancer* 75: 548-553.
- Yoshida, K.; Sugino, T.; Tahara, H.; Woodman, A.; Bolodeoku, J.; Nargund, V.; Fellows, G.; Goodison, S.; Tahara, E.; Tarin, D. (1997b) Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer* 79: 362-369.
- Yoshida, K.; Sakamoto, S.; Sumi, S.; Higashi, Y.; Kitahara, S. (1998) Telomerase activity in renal cell carcinoma. *Cancer* 83: 760-766.
- Yu, G.L.; Bradley, J.D.; Attardi, L.D.; Blackburn, E.H. (1990) In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature* 344: 126-132.
- Zakian, V.A. (1997) Life and cancer without telomerase. *Cell* 91: 1-3.

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、様々な細胞型における、複製年齢に対するテロメア長をグラフ化したものである。

【図2】 図2は、ヒトテロメラーゼの予想メカニズムを表したものである。

【図3】 図3は、テロメラーゼ反復アッセイ法に関する検出限界を具体的に示した実施例1に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図4】 図4は、磁気ビーズによるテロメラーゼ活性の単離を具体的に示した実施例2に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図5】 図5は、ダイナビーズ(Dynabeads)DNA DIRECTを用いたテロメラーゼ活性の単離を具体的に示した実施例3に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図6】 図6は、エポキシドビーズ量を増加させてテロメラーゼ活性を単離する方法を具体的に示した実施例4に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図7】 図7は、ビーズ法によるテロメラーゼ単離を行った後、残りの溶解画分におけるゲノムDNAの存在についてのテストを具体的に示した実施例5に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図8】 図8は、ポリマー磁気ビーズへのタンパク質の結合を具体的に示した実施例6に記載のSDS-PAGEゲルを示す。

【図9】 図9は、テロメラーゼ単離法の感度と信頼度を具体的に示した実施例7に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図10】 図10は、血液中循環性癌細胞の濃縮と、その後のテロメラーゼ活性の検出を具体的に示した実施例8に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図11】 図11は、乳癌患者胸膜の微小転移巣細胞におけるテロメラーゼ活性を具体的に示した実施例9に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図12】 図12は、TRAPアッセイ法によるテロメラーゼの単離と、微小転移巣細胞検出用細胞溶解物からのmRNAの単離との組合せを具体的に示すフローチャートである。

【図13】 図13は、大便から単離された結腸細胞中のテロメラーゼ活性

を検出する方法を具体的に示すフローチャートである。

図面参照用

図 3

レーン1:対照、細胞なし、レーン2:細胞40個、レーン3:細胞50個、レーン4:細胞75個、レーン5:細胞100個、レーン6:細胞500個、レーン7:陽性対照、レーン8:陰性PCR対照

図 4

レーンL:分子量ラダー (ladder) マーカー (10 bp)

レーン1:溶解物画分-100万個のダイナビーズ (Dynabeads(登録商標))を使用 (15 μ g)

レーン2:ビーズ画分-100万個のダイナビーズ (登録商標)を使用

レーン3:溶解物画分-1000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用 (150(g)

レーン4:ビーズ画分-1000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用

レーン5:溶解物画分-2000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用 (300(g)

レーン6:ビーズ画分-2000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用

レーン7:1000個のSW480細胞の溶解物-分画なしで試験

レーン8:キットのTSR8陽性対照2(1

図 5

レーン1:溶解物画分-1000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用 (150(g)

レーン2:ビーズ画分-1000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用

レーン3:溶解物画分-2000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用 (300(g)

レーン4:ビーズ画分-2000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用

レーン5:溶解物画分-3000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用 (450(g)

レーン6:ビーズ画分-3000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用

レーン7:陰性PCR対照

レーン8:キットのTSR8陽性対照2(1

図 6

レーン1:50(gのビーズ、レーン2:100(gのビーズ、レーン3:150(gのビーズ、レーン4:200(gのビーズ、レーン5:250(gのビーズ、レーン6:300(gのビーズ、レーン7

:350(gのビーズ、レーン8:400(gのビーズ、レーン9:TRAPアッセイ陽性対照、レーン10:陰性PCR対照

図 7

レーン1+2:10,000個の細胞と、ビーズ結合物質の溶出物、レーン3+4:5000個の細胞-ビーズ結合物質の溶出物、レーン5+6:1,000個の細胞-ビーズ結合物質の溶出物、レーン7+8:10,000細胞の溶解物から単離されたDNA、レーン9+10:5,000細胞の溶解物から単離されたDNA、レーン11+12:1,000細胞の溶解物から単離されたDNA、レーン13:陽性対照-10 ngの胎盤DNA、レーン14:陰性PCR対照、L:分子量標準マーカー-100 bpラダー

図 8

レーンH:高分子量標準マーカー;レーンL:低分子量標準マーカー;レーン1と2:ビーズからの溶出物(80000細胞からの抽出物);レーン3と4:ビーズからの溶出物(53000細胞からの抽出物)

図 9

レーン1~5:50細胞、レーン6:陽性対照、レーン7:陰性対照

図 1 0

レーン1:0細胞;レーン2:40細胞;レーン3:50細胞;レーン4:75細胞;レーン5:100細胞;レーン6:500細胞;レーン7:陽性対照(500細胞を直接試験)、レーン8:陰性対照

図 1 1

レーン1:胸膜試料(ビーズ単離テロメラーゼ);レーン2:胸膜試料(残りの溶解物);レーン3:胸膜試料の残り(溶出物);レーン4:胸膜試料の残り(溶解物);レーン5:陽性対照(鋳型TAR8);レーン6:陰性対照

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年2月27日(2001.2.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、様々な細胞型における、複製年齢に対するテロメア長をグラフ化したものである。

【図2】 図2は、ヒトテロメラーゼの予想メカニズムを表したものである。

【図3】 図3は、テロメラーゼ反復アッセイ法に関する検出限界を具体的に示した実施例1に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図4】 図4は、磁気ビーズによるテロメラーゼ活性の単離を具体的に示した実施例2に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図5】 図5は、ダイナビーズ(Dynabeads(登録商標))DNA DIRECTを用いたテロメラーゼ活性の単離を具体的に示した実施例3に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図6】 図6は、エポキシドビーズ量を増加させてテロメラーゼ活性を単離する方法を具体的に示した実施例4に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図7】 図7は、ビーズ法によるテロメラーゼ単離を行った後、残りの溶解画分におけるゲノムDNAの存在についてのテストを具体的に示した実施例5に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図8】 図8は、ポリマー磁気ビーズへのタンパク質の結合を具体的に示した実施例6に記載のSDS-PAGEゲルを示す。

【図9】 図9は、テロメラーゼ単離法の感度と信頼度を具体的に示した実施例7に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図10】 図10は、血液中循環性癌細胞の濃縮と、その後のテロメラー

ゼ活性の検出を具体的に示した実施例8に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図11】 図11は、乳癌患者胸膜の微小転移巣細胞におけるテロメラーゼ活性を具体的に示した実施例9に記載のポリアクリルアミドゲルを示す。

【図12】 図12は、TRAPアッセイ法によるテロメラーゼの単離と、微小転移巣細胞検出用細胞溶解物からのmRNAの単離との組合せを具体的に示すフローチャートである。

【図13】 図13は、大便から単離された結腸細胞中のテロメラーゼ活性を検出する方法を具体的に示すフローチャートである。

図面参照用

図3

レーン1:対照、細胞なし、レーン2:細胞40個、レーン3:細胞50個、レーン4:細胞75個、レーン5:細胞100個、レーン6:細胞500個、レーン7:陽性対照、レーン8:陰性PCR対照

図4

レーンL:分子量ラダー (ladder) マーカー (10 bp)

レーン1:溶解物画分-100万個のダイナビーズ (Dynabeads(登録商標))を使用 (15 μ g)

レーン2:ビーズ画分-100万個のダイナビーズ (登録商標)を使用

レーン3:溶解物画分-1000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用 (150(g)

レーン4:ビーズ画分-1000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用

レーン5:溶解物画分-2000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用 (300(g)

レーン6:ビーズ画分-2000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用

レーン7:1000個のSW480細胞の溶解物-分画なしで試験

レーン8:キットのTSR8陽性対照2(1

図5

レーン1:溶解物画分-1000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用 (150(g)

レーン2:ビーズ画分-1000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用

レーン3:溶解物画分-2000万個のダイナビーズ (登録商標)を使用 (300(g)

レーン4:ビーズ画分-2000万個のダイナビーズ(登録商標)を使用

レーン5:溶解物画分-3000万個のダイナビーズ(登録商標)を使用(450(g)

レーン6:ビーズ画分-3000万個のダイナビーズ(登録商標)を使用

レーン7:陰性PCR対照

レーン8:キットのTSR8陽性対照2(1

図 6

レーン1:50(gのビーズ、レーン2:100(gのビーズ、レーン3:150(gのビーズ、レーン4:200(gのビーズ、レーン5:250(gのビーズ、レーン6:300(gのビーズ、レーン7:350(gのビーズ、レーン8:400(gのビーズ、レーン9:TRAPアッセイ陽性対照、レーン10:陰性PCR対照

図 7

レーン1+2:10,000個の細胞と、ビーズ結合物質の溶出物、レーン3+4:5000個の細胞-ビーズ結合物質の溶出物、レーン5+6:1,000個の細胞-ビーズ結合物質の溶出物、レーン7+8:10,000細胞の溶解物から単離されたDNA、レーン9+10:5,000細胞の溶解物から単離されたDNA、レーン11+12:1,000細胞の溶解物から単離されたDNA、レーン13:陽性対照-10 ngの胎盤DNA、レーン14:陰性PCR対照、L:分子量標準マーカー-100 bpラダー

図 8

レーンH:高分子量標準マーカー;レーンL:低分子量標準マーカー;レーン1と2:ビーズからの溶出物(80000細胞からの抽出物);レーン3と4:ビーズからの溶出物(53000細胞からの抽出物)

図 9

レーン1~5:50細胞、レーン6:陽性対照、レーン7:陰性対照

図 10

レーン1:0細胞;レーン2:40細胞;レーン3:50細胞;レーン4:75細胞;レーン5:100細胞;レーン6:500細胞;レーン7:陽性対照(500細胞を直接試験)、レーン8:陰性対照

図 11

レーン1:胸膜試料(ビーズ単離テロメラーゼ);レーン2:胸膜試料(残りの溶解物);レーン3:胸膜試料の残り(溶出物);レーン4:胸膜試料の残り(溶解物);レーン5:陽

性対照(鋳型TAR8);レーン6:陰性対照

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年4月20日(2001.4.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記工程

(a)テロメラーゼが固相に結合する条件下で、ヒト被験者または被験動物から採取された試料を固相で処理する工程、

(b)処理済みの試料から固相を分離し、該固相から結合テロメラーゼを溶出させる処理を選択的に行なって被験試料を作成する工程、および

(c)被験試料のテロメラーゼ活性を測定する工程
を包含し、

該試料中のテロメラーゼ活性の検出は、被験物における癌の指標となるものである癌の診断方法または予測方法。

【請求項2】 工程(c)において、前記固相のテロメラーゼ活性を測定するものである請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記試料は標的細胞全体を含み、該細胞を工程(a)により処理して溶解物を作成し、固相に結合させる為にテロメラーゼを遊離させるものである請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 標的細胞全体を含む前記試料は、工程(a)の前に選別工程を行い、試料中の標的細胞全体を単離する細胞集団の混合物を含有するものである請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記選別工程は、フローサイトメトリーによる選別工程、または標的細胞全体に対する固相アフィナント(affinant)に標的細胞全体を結合させる工程を包含するものである請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記アフィナントは、テロメラーゼを結合する為に固相上に

存在するものである請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記アフィナントは、標的細胞に特異的な抗体を含有するものである請求項5または6に記載の方法。

【請求項8】 前記アフィナントは上皮細胞に特異的である請求項5～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 前記細胞集団の混合物は、血液、骨髓、胸水、尿、唾液、痰、大便、髄液、頸部スミア、頬側スワブまたは生検針試料に由来するものである請求項4～8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 前記試料中のテロメラゼ活性は更に、被験物の微小転移巢の指標となるものである請求項9に記載の方法。

【請求項11】 前記固相は粒子状材料を含有するものである請求項1～10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】 前記粒子状材料はポリマービーズを含有するものである請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記ポリマービーズの直径は1 μ から6 μ mの範囲内である請求項12に記載の方法。

【請求項14】 前記粒子状材料は磁性を帯びたものである請求項12～13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】 テロメラゼ活性を測定する前記工程(c)は、テロメア反復測定プロトコルを用いるものである請求項1～14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】 テロメラゼが固相に結合するよう、試料を固相で処理し、且つ、該固相中のテロメラゼ活性を測定することによって、該試料中のロメラゼ活性を検出する為の固相の使用。

【請求項17】 請求項1～15のいずれかに記載の方法における、請求項18に記載の固相の使用。

【請求項18】 テロメラゼを結合させる為の固相、およびテロメラゼ活性を測定する為の一種以上の成分を含有し、且つ、該固相はテロメラゼを結合する為に使用されるものであるテロメラゼ活性検出用キットの使用。

【請求項19】 前記固相は粒子状材料を含有するものである請求項18に記載の使用。

【請求項20】 前記粒子状材料はポリマービーズを含有するものである請求項19に記載の使用。

【請求項21】 前記ポリマービーズの直径は1 μ から6 μ mの範囲内である請求項20に記載の使用。

【請求項22】 前記粒子状材料は磁性を帯びたものである請求項19～21のいずれかに記載の使用。

【請求項23】 テロメラーゼを結合させる為の固相、およびテロメラーゼ活性を測定する為の一種以上の成分を含有し、該固相は標的細胞全体を結合させる為のアフィナント (affinant) を含有するものであるテロメラーゼ活性検出用キット。

【請求項24】 テロメラーゼを結合させる為の固相、およびテロメラーゼ活性を測定する為の一種以上の成分を含有し、更に、標的細胞全体を結合させる為の第二の固相を含有するものであるテロメラーゼ活性検出用キット。

【請求項25】 前記第二の固相は、標的細胞全体を結合させる為のアフィナントを含有するものである請求項24に記載のキット。

【請求項26】 前記アフィナントは、標的細胞に特異的な抗体を含有するものである請求項23または25に記載のキット。

【請求項27】 前記アフィナントは上皮細胞に特異的である請求項23、25または26のいずれかに記載のキット。

【請求項28】 テロメラーゼ活性を測定する為の前記一種以上の成分は、テロメラーゼ伸長の為の基質を含有するものである請求項23～27のいずれかに記載のキット。

【請求項29】 前記テロメラーゼ伸長の為の基質は、テロメラーゼを結合させる為の固相上に存在するものである請求項28に記載のキット。

【請求項30】 テロメラーゼ活性を測定する為の前記一種以上の成分は、テロメア反復測定プロトコルの為の成分を含有するものである請求項23～29のいずれかに記載のキット。

【請求項31】 テロメラーゼ活性を測定する為の前記一種以上の成分は、テロメラーゼ産物を増幅する為のオリゴヌクレオチドプライマーを含有するものである請求項23～30のいずれかに記載のキット。

【請求項32】 癌細胞を検出する為の、請求項23～31のいずれかに記載のキットの使用。

【請求項33】 前記キットは、更に、癌を診断する為のmRNAを測定する手段を含むものである請求項32に記載の使用。

【手続補正2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0028

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0028】

発明の概要

第一の態様において、下記工程

(a)テロメラーゼが固相に結合する条件下で、ヒト被験者または被験動物から採取された試料を固相で処理する工程、

(b)処理済みの試料から固相を分離し、該固相から結合テロメラーゼを溶出させる処理を選択的に行なって被験試料を作成する工程、および

(c) 被験試料のテロメラーゼ活性を測定する工程
を包含し、

該試料中のテロメラーゼ活性の検出は、被験物における癌の指標となるものである癌の診断方法または予測方法を提供する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0029

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0029】

更なる態様において、本発明は、テロメラーゼが固相に結合するよう、固相で試料を処理し、且つ、該固相中のテロメラーゼ活性を測定することによって試料中のテロメラーゼ活性を検出する為の固相の使用を提供する。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

更なる態様において、本発明は、テロメラーゼを結合させる為の固相、およびテロメラーゼ活性を測定する為の一種以上の成分を含有し、該固相はテロメラーゼを結合させる為に使用されるものであるテロメラーゼ活性検出用キットの使用を提供する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0031】

更なる態様において、本発明は、テロメラーゼを結合させる為の固相、およびテロメラーゼ活性を測定する為の一種以上の成分を含有し、該固相は標的細胞全体を結合させる為のアフィナントを含有するものであるテロメラーゼ活性検出用キットを提供する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

更なる態様において、本発明は、テロメラーゼを結合させる為の固相、およびテロメラーゼ活性を測定する為の一種以上の成分を含有し、更に、標的細胞全体を結合させる為の第二の固相を含有するものであるテロメラーゼ活性検出用キットを提供する。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0033】

更なる態様において、本発明は本明細書に記載する通り、癌細胞検出用キットの使用を提供する。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/IB 00/00100

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/573 C12Q1/48		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 15687 A (KIM NAM WOO ;GERON CORP (US); HARLEY CALVIN B (US); WEINRICH SCOTT) 1 May 1997 (1997-05-01) abstract page 17, paragraph 3 -page 18, paragraph 2	1-36
X	WO 98 37241 A (TM TECHNOLOGIES INC ;FALDASZ BRIAN D (US); LANE MICHAEL J (US); BE) 27 August 1998 (1998-08-27) claims 1,2 --- -/--	1-36
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 May 2000		26/06/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 551 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Pellegrini, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/IB 00/00100

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM N.W. ET AL.: "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer" SCIENCE, vol. 266, 1994, pages 2011-2015, XP002138759 cited in the application the whole document	1-36
A	BROCCOLI D. ET AL.: "Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 92, 1995, pages 9082-9086, XP002138760 cited in the application page 9083, column 1, paragraph 3	1-36
A	US 5 648 215 A (WRIGHT WOODRING E ET AL) 15 July 1997 (1997-07-15) claims	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No.

PCT/IB 00/00100

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9715687 A	01-05-1997	US 5837453 A	17-11-1998
		US 5863726 A	26-01-1999
		US 5804380 A	08-09-1998
		AU 6380896 A	15-05-1997
		JP 11507839 T	13-07-1999
		US 5891639 A	06-04-1999
WO 9837241 A	27-08-1998	AU 6339598 A	09-09-1998
US 5648215 A	15-07-1997	US 5989807 A	23-11-1999
		US 5830644 A	03-11-1998
		US 5645986 A	08-07-1997
		US 5695932 A	09-12-1997
		US 5489508 A	06-02-1996
		US 5639613 A	17-06-1997
		US 5693474 A	02-12-1997
		AU 682082 B	18-09-1997
		AU 1209095 A	29-05-1995
		AU 6058298 A	04-06-1998
		CA 2173872 A	18-05-1995
		EP 0728207 A	28-08-1996
		JP 11243998 A	14-09-1999
		JP 2875394 B	31-03-1999
		JP 9502102 T	04-03-1997
		WO 9513381 A	18-05-1995
		US 5891639 A	06-04-1999
		US 5629154 A	13-05-1997
		US 5837453 A	17-11-1998
		US 5863726 A	26-01-1999
		US 5804380 A	08-09-1998
		AU 1178195 A	29-05-1995
		AU 1330795 A	29-05-1995
		WO 9513382 A	18-05-1995
		US 5686306 A	11-11-1997
		WO 9513383 A	18-05-1995
		AU 688262 B	12-03-1998
		AU 4374093 A	13-12-1993
		AU 7183698 A	20-08-1998
		AU 8949598 A	07-01-1999
		AU 8949698 A	14-01-1999
		CA 2135648 A	25-11-1993
		CA 2245461 A	25-11-1993
		CA 2245462 A	25-11-1993
		EP 0642591 A	15-03-1995
		JP 11123100 A	11-05-1999
		JP 11127874 A	18-05-1999
		JP 8501079 T	06-02-1996
		WO 9323572 A	25-11-1993
		US 5744300 A	28-04-1998
		US 5686245 A	11-11-1997
		US 5840495 A	24-11-1998
		US 5707795 A	13-01-1998
		US 6007989 A	28-12-1999

フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA12 BA07 CA05 CA12 HA12
HA19
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ21 QR32
QR36 QS02 QS25 QS32 QS36
QX02